

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAROLINE RIGOTTO**

**PROPOSTA DA UTILIZAÇÃO DE ADENOVÍRUS COMO  
INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO VIRAL HUMANA EM  
OSTRAS DE CULTIVO**

**Florianópolis, 2003.**

**CAROLINE RIGOTTO**

**PROPOSTA DA UTILIZAÇÃO DE ADENOVÍRUS COMO  
INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO VIRAL HUMANA EM  
OSTRAS DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Célia Regina Monte Barardi**

**Florianópolis, 2003.**

RIGOTTO, Caroline

Proposta da Utilização de Adenovírus como Indicadores de Contaminação Viral Humana em Ostras de Cultivo / Caroline Rigotto. Florianópolis, 2003. 117p.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. Adenovírus – 2. Vírus Norwalk-like – 3. Ostras – 4. PCR

## **AGRADECIMENTOS**

---

À Prof<sup>a</sup>. Célia Regina Monte Barardi, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela valiosa orientação, e principalmente grande amizade e confiança nestes anos de convívio.

À Prof<sup>a</sup>. Cláudia Maria Oliveira Simões, pelas sugestões, apoio e amizade.

Aos professores Mário Steindel e Edmundo Grisard, pela amizade e ajuda oferecida no decorrer deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Carlos Zanetti, pelas sugestões na apresentação do projeto e da dissertação e agradável convívio.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia Aplicada pelo trabalho em conjunto e companheirismo.

À Thaís, companheira de trabalho pelo grande apoio, sugestões e contribuições científicas a este trabalho.

Às grandes amigas que fiz durante a realização deste trabalho, Carla, Roni e Thaís.

À minha mãe e meu irmão, pelo apoio desde o início da minha formação e pela paciência.

Ao Ricardo, pelo amor e principalmente compreensão em todos os momentos.

À todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Este trabalho teve o financiamento do BMLP (Programa Brasileiro de Apoio à Maricultura) através do Programa CIDA (Canadian International Cooperation Agency).

Também recebeu apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina e do CNPq através da concessão da bolsa de Mestrado.

## SUMÁRIO

|   |             |
|---|-------------|
| <b><u>RESUMO</u></b>  | <b>viii</b> |
| <b><u>ABSTRACT</u></b>  | <b>ix</b>   |
| <b><u>INTRODUÇÃO</u></b>  | <b>1</b>    |
| <u>1- QUADRO GERAL DA MARICULTURA NO ESTADO DE SANTA CATARINA</u>           | 2           |
| <u>2- OS VÍRUS ENTÉRICOS</u>  | 3           |
| <u>3- OS VÍRUS NORWALK-LIKE (NLVS)</u>                                      | 6           |
| <u>4- OS ADENOVÍRUS (AdVs)</u>  | 10          |
| <u>5- HÁBITO ALIMENTAR E CAPACIDADE DE BIOACUMULAÇÃO DOS MOLUSCOS</u>       | 15          |
| <u>6- LEGISLAÇÃO VIGENTE EM RELAÇÃO AOS SISTEMAS DE CULTIVO DE MOLUSCOS</u> | 16          |
| <u>7- METODOLOGIAS DISPONÍVEIS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS EM MOLUSCOS</u>       | 17          |
| <b><u>OBJETIVOS</u></b>   | <b>23</b>   |
| <u>1- GERAIS</u>  | 24          |
| <u>2- ESPECÍFICOS</u>   | 24          |
| <b><u>MATERIAIS E MÉTODOS</u></b>   | <b>26</b>   |
| <u>1- MATERIAIS BIOLÓGICOS</u>  | 27          |
| <u>1.1- Vírus</u>   | 27          |
| <u>1.2 Ostras</u>   | 28          |
| <u>1.2.1- Amostras ambientais</u>   | 28          |
| <u>2- CULTIVO DE CÉLULAS HEP-2</u>  | 29          |
| <u>3- PREPARO DAS SUSPENSÕES DE ADENOVÍRUS PADRÃO</u>                       | 30          |
| <u>4- PREPARO DAS SUSPENSÕES DE FEZES</u>                                   | 30          |
| <u>5- TITULAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ADENOVÍRUS PADRÃO</u>                       | 31          |
| <u>5.1- Método das diluições-limite (TCID<sub>50</sub>)</u>                 | 31          |
| <u>5.2- Método de contagem de placas de lise</u>                            | 32          |
| <u>6- PREPARAÇÃO DE EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS</u>                       | 34          |
| <u>7- EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS</u>                                     | 37          |

|   |           |
|---|-----------|
| <u>7.1- Extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico do DNA viral a partir das suspensões de adenovírus padrão</u>  | 37        |
| <u>7.2- Extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico do DNA viral de Adv a partir dos extratos de ostras</u>  | 38        |
| <u>7.3- Extração com Trizol<sup>®</sup> do RNA de NLVs a partir das suspensões de fezes</u>   | 39        |
| <u>7.4- Extração com Trizol<sup>®</sup> do RNA viral de NLVs a partir dos extratos de ostras</u>  | 40        |
| <b>8- QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL</b>  | 40        |
| <b>9- ENSAIO DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DOS VÍRUS NORWALK-LIKE EXTRAÍDOS A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE FEZES E DO EXTRATO DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADO.</b> | 41        |
| <u>9.1- Transcrição reversa:</u>  | 41        |
| <u>9.2- Determinação da concentração ideal dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR para NLVs</u>   | 42        |
| <b>10- ENSAIOS DE PCR E NESTED-PCR PARA A DETECÇÃO DO DNA DOS ADVS</b>  | 44        |
| <u>10.1- Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u>   | 45        |
| <u>10.2- Reação de nested-PCR</u>   | 45        |
| <b>11- DETERMINAÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR E NESTED-PCR PARA ADENOVÍRUS</b>  | 46        |
| <u>11.1- Limite de sensibilidade das reações de PCR e nested-PCR realizados com as suspensões de Ad5 padrão.</u>  | 46        |
| <u>11.2- Limite de sensibilidade da PCR e nested-PCR para extratos de ostras experimentalmente inoculados.</u>  | 48        |
| <b>12- AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE OSTRAS</b>   | 49        |
| <b>13- DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS ATRAVÉS DO ENSAIO DE PCR INTEGRADO A CULTURA CELULAR (ICC-PCR)</b>  | 51        |
| <b>14- DETECÇÃO DOS ADENOVÍRUS PRESENTES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS</b>   | 54        |
| <b>15- VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR E NESTED-PCR</b>  | 54        |
| <b>RESULTADOS</b>   | <b>55</b> |
| <u>1- CULTIVO DAS CÉLULAS HEp-2</u>   | 56        |
| <u>2- OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ADENOVÍRUS PADRÃO</u>  | 56        |
| <u>3- TÍTULO INFECCIOSO DO AD5 PADRÃO</u>   | 56        |
| <u>3.1- MÉTODO DAS DILUIÇÕES-LIMITE</u>   | 56        |
| <u>3.2- Método de contagem de placas de lise</u>  | 57        |
| <u>4- QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL DOS NLVS</u>   | 57        |
| <u>5- ENSAIO DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DOS NLVS</u>  | 57        |
| <u>5.1- Transcrição reversa</u>   | 57        |
| <u>5.2- Determinação da concentração ideal dos componentes do tampão e pH para a reação de PCR para os NLVs</u>   | 58        |

|  |           |
|--|-----------|
| <u>6- ENSAIOS DE PCR E NESTED-PCR PARA A DETECÇÃO DE DNA DOS ADV</u>   | 61        |
| <u>6.1- Padronização da concentração ideal de DNA para o nested-PCR</u>  | 61        |
| <u>6.2- Reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested- PCR para o DNA viral obtido a partir das suspensões de Ad5 padrão</u>   | 61        |
| <u>6.2.1- Limite mínimo de detecção do DNA viral</u>   | 61        |
| <u>6.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested- PCR para o DNA viral obtido a partir dos extratos de ostras experimentalmente inoculados com suspensões de Ad5 padrão</u> | 64        |
| <u>6.3.1- Limite mínimo de detecção do DNA viral</u>   | 64        |
| <u>7- AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE OSTRAS</u>   | 65        |
| <u>8- DETECÇÃO DOS ADENOVÍRUS ATRAVÉS DO ENSAIO DE PCR ASSOCIADO À CULTURA CELULAR (ICC-PCR)</u>   | 66        |
| <u>8.1 Ensaio de ICC-PCR para detecção de adenovírus em suspensões de Ad5 padrão</u>   | 66        |
| <u>8.2 Ensaio de ICC-PCR para detecção de adenovírus em extratos de ostras experimentalmente inoculadas</u>  | 67        |
| <u>9- DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS PRESENTES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS</u>  | 69        |
| <u>10- ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA</u>  | 69        |
| <b><u>DISCUSSÃO</u></b>  | <b>73</b> |
| <u>1- ENSAIO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DE NLVs EM SUSPENSÕES DE FEZES E OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS</u>  | 79        |
| <u>2- ENSAIOS DE PCR E NESTED-PCR UTILIZANDO SUSPENSÕES DE Ad5 PADRÃO E OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS</u>  | 81        |
| <u>3- ENSAIO DE PCR ASSOCIADO À CULTURA CELULAR (ICC-PCR) PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS EM OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS.</u>  | 83        |
| <u>4- ENSAIOS DE PCR E NESTED-PCR PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS PRESENTES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS</u>   | 85        |
| <b><u>CONCLUSÕES</u></b>   | <b>89</b> |
| <b><u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u></b>   | <b>92</b> |
| <b><u>REFERÊNCIAS</u></b>  | <b>94</b> |

## RESUMO

---

Com o grande crescimento da maricultura em Santa Catarina, tornou-se necessário verificar mais profundamente a qualidade sanitária destes animais como também da água onde os mesmos são cultivados. Segundo a nova legislação (CONAMA - 20), a qualidade sanitária dos alimentos de origem marinha deve ser atestada através da ausência de *Salmonella sp* e de níveis aceitáveis de estafilococcus coagulase positiva. Porém, hoje em dia sabe-se que moluscos cultivados em área com níveis aceitáveis de bactérias podem estar contaminados por vírus, já que métodos para remoção de bactérias por depuração, nem sempre removem os demais patógenos contaminantes. Os vírus Norwalk-like (NLV), são mundialmente reconhecidos como a principal causa de surtos de gastroenterites não bacteriana em adultos. Estes vírus têm sido também associados a surtos de gastroenterites associadas ao consumo de moluscos bivalves, já que eles se alimentam através de filtração, podendo bioacumular diversos patógenos em seus tecidos. Os adenovírus (AdVs) humanos são agentes que podem causar infecções oculares, respiratórias e gastrointestinais e são, freqüentemente, detectados em águas de esgoto e do mar, uma vez que todos os sorotipos são liberados através das fezes no meio ambiente. O presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de RT-PCR para a detecção dos vírus NLV, e as técnicas de PCR, *nested*-PCR e PCR associado à cultura celular (ICC-PCR) para a detecção dos AdVs em experimentalmente infectadas visando a utilização destes como indicadores de contaminação viral humana no meio ambiente. Também foram coletadas ostras da espécie *Crassostrea gigas* em três pontos de cultivo de Florianópolis, SC, durante os meses de abril a outubro de 2002 a fim de monitorar a presença natural de adenovírus através dos ensaios de PCR, e *nested*-PCR. Os resultados obtidos mostraram que a técnica de *nested*-PCR para detecção de adenovírus em ostras foi mais sensível que a de PCR, sendo que os limites mínimos de vírus detectados foram de 1,2 PFU/g de tecido e  $1,2 \times 10^2$  PFU/g de tecido, respectivamente. Este resultado também se repetiu quando as amostras ambientais foram analisadas, onde 90% das amostras foram positivas para adenovírus através da técnica de *nested*-PCR e nenhuma foi positiva utilizando somente uma reação de amplificação. O ensaio de ICC-PCR demonstrou a mesma sensibilidade que o de PCR para detecção de adenovírus experimentalmente inoculados em ostras. Finalmente, constatou-se que estudos mais aprofundados são necessários para a detecção de NLVs em ostras, uma vez que não foi possível detectá-los em extratos de ostras experimentalmente inoculadas, pelos métodos empregados neste trabalho. O presente trabalho permitiu padronizar as metodologias de PCR e *nested*-PCR para a utilização de adenovírus como um indicador biológico de contaminação biológica no meio ambiente, visando o monitoramento da sanidade dos moluscos de cultivo.

**ABSTRACT**

---

In recent years “Norwalk-like viruses” (NLVs) have emerged as the single most common cause of outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in people of all age groups and they have frequently been associated with gastroenteritis following consumption of sewage-contaminated shellfish. Adenoviruses (AdVs) are common pathogens often associated with respiratory and gastrointestinal illness and/or conjunctivitis in young people. Both enteric and non-enteric adenoviruses, cause diarrhoea, and may be shed into the gut and be isolated from faeces. The main goal of the present work was to standardize an integrated-cell culture-PCR methodology (ICC-PCR) and also molecular methods as RT-PCR, PCR and *nested*-PCR for the detection of AdVs and NLVs in artificially seeded oysters, to use them as biological indicators of human viral contamination in the environment. Oysters were collected from three mariculture farms in Florianópolis, SC, during April to October of 2002 with the goal to detect natural adenovirus contamination. The maximum sensitivity of these methods were assayed for AdVs detection. The results showed that the *nested*-PCR was more sensitive (1.2 PFU/g of tissue) than PCR and ICC-PCR (both  $1,2 \times 10^2$  PFU/g of tissue) to detect AdVs from oysters extracts. The *nested*-PCR method were able to detect 90% of natural contamination with AdVs in the harvested oysters samples and none sample were positive to AdVs using only one single round PCR. Further tests will be required to detect NLVs from oyster extracts, because the techniques employed in the present work did not succeed in NLV detection in oyster extracts. The present work indicated the use of human adenoviruses as a molecular index for the presence of human viruses in general environment and shellfish, using a two-step amplification procedure.

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1- QUADRO GERAL DA MARICULTURA NO ESTADO DE SANTA CATARINA

A maricultura, como é chamado o cultivo de ostras e mexilhões, é uma atividade recente no Estado de Santa Catarina. Ela surgiu em 1988, graças a um convênio entre a Universidade Federal de Santa Catarina e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado (Epagri), que levaram a tecnologia do cultivo de moluscos bivalves para as comunidades pesqueiras. Os resultados desses experimentos foram altamente positivos fazendo com que muitas pessoas adotassem a atividade como uma importante fonte de renda (EPAGRI, 2000).

O litoral catarinense caracteriza-se por apresentar condições favoráveis ao cultivo de moluscos marinhos (WINKLER et al., 1998). Atualmente, a espécie de ostra *Crassostrea gigas* ou ostra do Pacífico é cultivada no Estado de Santa Catarina, onde se desenvolve perfeitamente devido às características climáticas da região, como a baixa temperatura da água e grande quantidade de baías (NASCIMENTO, 1983).

A expansão da maricultura no Brasil foi impulsionada pelo governo canadense, através da CIDA (Canadian International Cooperation Agency), que criou o Programa Brasileiro Ligado à Maricultura (em inglês, Brazilian Mariculture Linkage Program – BMLP). De forma geral, o BMLP objetiva apoiar a maricultura tropical visando respeitar o meio ambiente e preservando a saúde pública com a produção de alimentos de boa qualidade, que possam ser absorvidos pelos mercados locais e internacionais. Ainda, como objetivos do BMLP, constam o desenvolvimento de facilidades e transferência de tecnologias em maricultura, bem como aplicações de metodologias desenvolvidas nos laboratórios de pesquisa diretamente nas comunidades de maricultores.

Os principais municípios produtores de ostras em Santa Catarina são: Florianópolis, Penha, Governador Celso Ramos, Bombinhas, Palhoça e Porto Belo, sendo que a maioria dos produtores localiza-se em Florianópolis (LCMM, 2000).

Num período de sete anos (1991-1998), a produção de ostras no Estado aumentou gradativamente. De 1998 para 1999, a produção aumentou de 219 mil dúzias para 605 mil, evidenciando um crescimento de 200%. No ano de 2002, a produção chegou a 1 milhão e 283 mil dúzias de ostras. Florianópolis é hoje o maior produtor de ostras do Brasil, (dados obtidos da EPAGRI, SC; BARARDI et al., 2001).

Tendo em vista os aspectos de contaminação viral e bacteriana das águas e por ser a maricultura uma atividade em crescimento e de importância econômica e social, o controle da qualidade sanitária dos produtos da maricultura se faz necessário e urgente, já que a água é reconhecida como um veículo potencial para a transmissão de inúmeras doenças e, ainda hoje, a etiologia de muitas epidemias provocadas por patógenos transmitidos pela água permanece desconhecida (CRAUN, 1986; KOPECKA et al., 1993; PINA et al., 1998; SCHWAB et al., 2001).

## **2- OS VÍRUS ENTÉRICOS**

Os vírus entéricos se encontram distribuídos por todas as partes do mundo e são responsáveis por diversas doenças que afetam o ser humano, tais como gastroenterites, meningites, miocardites e hepatites infecciosas.

A gastroenterite é um problema de âmbito mundial, sendo responsável pela morte de aproximadamente 5 a 10 milhões de pessoas ao ano (TORTORA et al., 2000; WHITE & FENNER, 1994). Tal patologia caracterizada por diarreia associada ou não a

febre e vômitos podem levar a morte por intensa desidratação e assume importante papel na mortalidade infantil (MEDEIROS et al., 2001; QIAO et al., 1999).

A gastroenterite pode ser provocada por diversos patógenos, como as bactérias *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., o protozoário *Cryptosporidium* e os vírus entéricos como rotavírus, adenovírus, astrovírus e calicivírus (MEDEIROS et al., 2001).

Os agentes etiológicos da gastroenterite, por habitarem o trato intestinal humano, são encontrados em grandes concentrações nas fezes dos indivíduos infectados. Desta forma, a principal via de transmissão destes patógenos é a fecal-oral, mas atualmente vem sendo também relacionada a esses patógenos, uma via de transmissão ambiental, diretamente, através das águas (potável, de piscinas, aerossóis) ou indiretamente, através da ingestão de alimentos contaminados (moluscos bivalves, vegetais, gelo, ou alimentos inadequadamente cozidos) (JAIKUS et al., 1994; LEES, 2000; CHEESBROUGH, 2000).

A presença de vírus entéricos nas águas de esgoto representa um grande risco a população, pois estas águas são lançadas em rios, córregos e até mesmo no mar, contaminando as águas de recreação, consumo humano e de cultivo de moluscos (PINA et al., 1998). A quantidade de enterovírus presentes na água é altamente variável dependendo de fatores, tais como nível de higiene, densidade populacional, prevalência de infecções na comunidade local e estação do ano (KOPECKA et al., 1993). Em todo o mundo, freqüentemente tem sido relatados surtos de gastroenterites de etiologia viral entre consumidores de ostras cruas ou mal cozidas, provenientes de áreas poluídas (CROMEANS, NAINAN, MARGOLIS, 1997; LE GUYADER et al., 2000; LEES, 2000; LEGEAY et al., 2000).

Posteriormente à ingestão pelo homem, os vírus entéricos humanos se replicam no trato gastrointestinal e são eliminados em grandes quantidades juntamente com as fezes ( $10^8$  a  $10^{11}$  partículas virais/g de fezes) para as águas de esgoto, sobrevivendo no ambiente com relativa estabilidade se as fezes não forem adequadamente tratadas (KOPECKA et al., 1993). No meio ambiente, estes vírus são capazes de se agregar rapidamente às partículas sólidas, protegendo-se desta forma dos fatores inativantes do ambiente, o que favorece sua sobrevivência. Estes vírus possuem uma certa resistência aos agentes físico-químicos de inativação podendo sobreviver de 2 a 130 dias na água do mar (TRABELSI et al., 1995; NICAND, TEYSSOU, BUISSON, 1998).

Mesmo em pequenas concentrações, os vírus presentes em meio hídrico podem causar doenças quando ingeridos, uma vez que uma unidade infecciosa é suficiente para desencadear o processo de infecção (PUIG et al., 1994; CRABTREE et al., 1997).

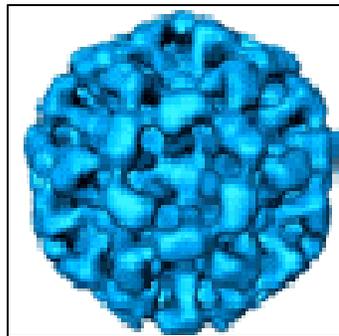
Entre os vírus entéricos mais importantes, transmitidos pelos moluscos e outros alimentos ao homem, estão os calicivírus, astrovírus, rotavírus, adenovírus, enterovírus e os vírus das hepatites A e E (LEES, 2000).

A Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental descreve o grupo dos vírus entéricos como sendo o mais significativo, confiável e eficiente modelo a ser usado para o monitoramento ambiental (PUIG et al., 1994; BOSCH et al., 1996).

### 3- OS VÍRUS NORWALK-LIKE (NLVS)

Os NLVs são vírus entéricos, previamente conhecidos como “small round-structured viruses” (SRSVs), pertencentes à família Caliciviridae (FLINT et al., 2000).

Os calicivírus humanos são um grupo de vírus que possuem o genoma de RNA simples fita não segmentada e morfologia arredondada e pequena onde, na superfície, encontram-se pequenos cálices ou uma estrutura amorfa, não caracterizada (SRSVs); o diâmetro dos calicivírus é de aproximadamente 35nm (LEES, 2000; CDC, 2001) (Figura 1).



**FIGURA 1**- Representação esquemática da morfologia dos NLVs  
Fonte: [www.virology.net](http://www.virology.net)

A taxonomia recente propõe a classificação dos calicivírus humanos em dois gêneros: os Norwalk-like contendo a morfologia de superfície SRSV e os Sapporo-like, com morfologia clássica (LEES, 2000).

O gênero dos NLVs representa um grupo de linhagens geneticamente diversas separadas em 3 genogrupos (LEES, 2000; CDC, 2001):

- genogrupo 1 (G1): abrange os vírus Norwalk e mais 4 linhagens;

- genogrupo 2 (G2): abrange os vírus *Snow Mountain, Hawaii* e mais 8 linhagens;
- genogrupo 3 (G3): abrange linhagens que infectam suínos e bovinos.

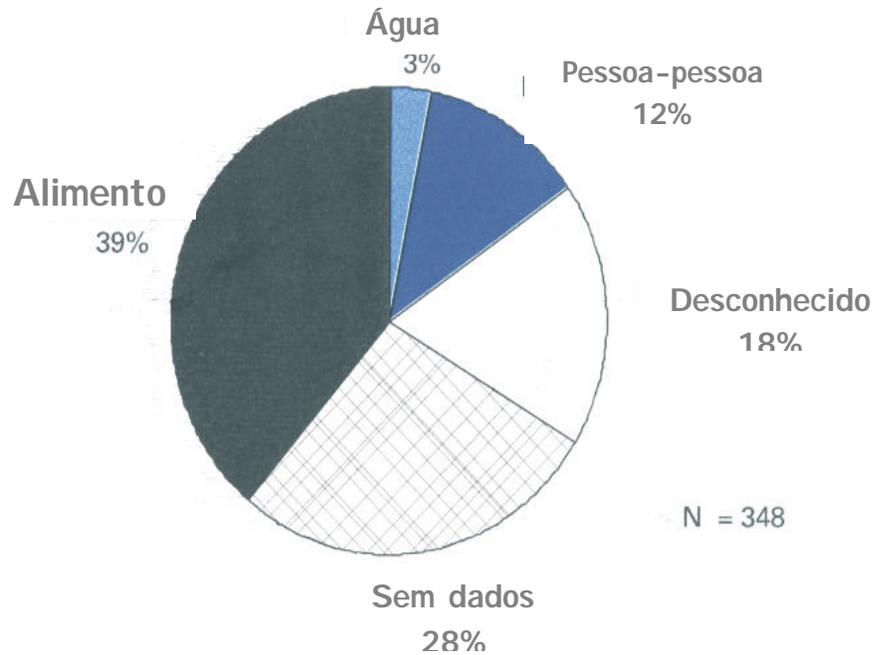
Dados recentes indicam que o genogrupo 2 (NLVs) é o de maior prevalência no mundo, sendo reconhecidos como a principal causa de surtos epidêmicos de gastroenterites, ocorrendo em todas as idades, incluindo crianças e adultos. Esta evidência sugere que os NLVs são a principal causa de gastroenterites não bacterianas, em adultos (SCHWAB et al., 2000; SCHWAB et al., 2001; LEES, 2000; BEURET et al., 2003).

Anualmente, aproximadamente 267.000.000 casos de diarreia com 612.000 hospitalizações e 3.000 mortes ocorreram em adultos nos Estados Unidos (CDC, 2001). Recentemente, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), publicou que 96% dos casos de gastroenterites não bacterianas nos EUA são causados por NLVs (SCHWAB, 2001; BEURET, 2003). Em outros países como a Inglaterra e Noruega, os NLVs têm sido a causa de infecções intestinais causando 43% dos surtos durante 1995 e 1996, comparado com 15% das contaminações por salmonelas (LEES, 2000). No Brasil, não há estudos epidemiológicos disponíveis.

Os sintomas clínicos incluem náuseas, vômitos, diarreia, febre e dores abdominais, com período de incubação de 1-4 dias (LEES, 2000). A desidratação severa, causada pelos NLVs, pode ser fatal, especialmente, em pessoas idosas com condições de saúde debilitada ou imunodeprimidos. Em pessoas saudáveis, geralmente, ocorre uma completa recuperação sem maiores complicações (LEES, 2000).

A via fecal-oral é, provavelmente, o modo de transmissão mais comum, porém o transporte pelo ar pode facilitar a transmissão durante os surtos de gastroenterites (CHEESBROUGH, 2000). Dos 348 surtos de gastroenterites causados por NLVs, relatados pelo CDC, durante janeiro de 1996 a novembro de 2000, a contaminação por alimentos ocorreu em 39% dos casos, 12% através do contato pessoa-pessoa, 3% pela água e 18% não pode ser relacionado com um tipo específico de transmissão (Figura 2) (CDC, 2001).

As características dos NLVs facilitam sua transmissão durante as epidemias, como por exemplo, a baixa taxa de partículas virais necessária para a infecção ( $<10^2$ ), o período assintomático de até 2 semanas, existência de muitas linhagens antigênicas, baixa imunogenicidade (infecções na infância não geram resposta imunológica nos adultos) (CDC, 2001). Estes vírus têm a habilidade de resistir a altos níveis de cloração da água e variações de temperaturas, facilitando sua transmissão através de água para o consumo e de recreação, gelo comercial e alguns alimentos como ostras cozidas e cruas (CANNON et al., 1991; KIRKLAND et al., 1996; CDC, 2001). Devido a diversidade das linhagens dos NLVs, as reinfecções acabam ocorrendo ao longo da vida (CDC, 2001).



(Dados CDC, 2001)

**FIGURA 2-** fonte de transmissão dos 348 casos de gastroenterites por NLV reportados pelo CDC no período de janeiro 1996 a novembro 2000. Fonte: CDC (2002)

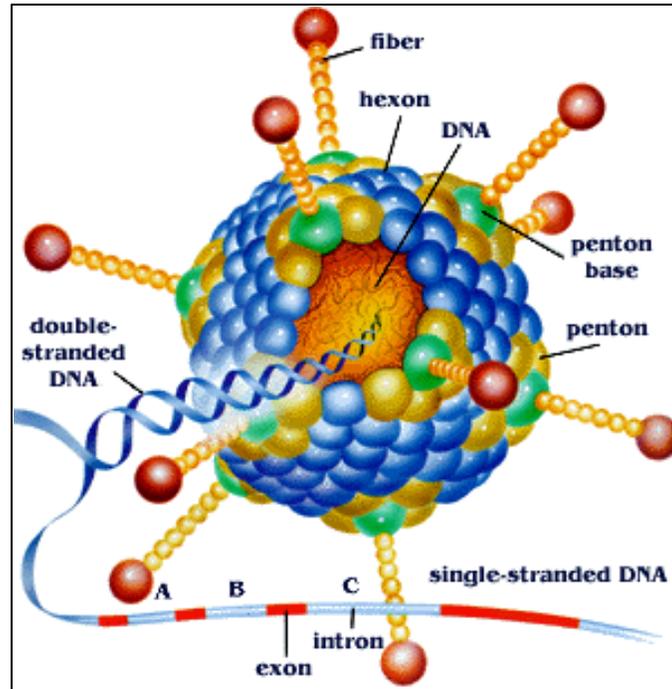
Em relação à transmissão dos NLVs por alimentos, os moluscos bivalves, como as ostras, são uma importante fonte de contaminação, visto que estas podem concentrar em seus tecidos os contaminantes da água. Como estes vírus podem estar presentes mesmo nas águas com padrões bacteriológicos e de higiene adequados e podem não ser inativados pelo cozimento ou fervura, esta possibilidade torna-se bastante provável (LEES, 2000; LE GUYADER, 2000; LEGEAY, 2000; CDC, 2001).

#### 4- OS ADENOVÍRUS (AdVs)

Os adenovírus pertencem à família Adenoviridae e são subdivididos em 2 gêneros: *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*. No primeiro são encontrados os agentes que acometem mamíferos e marsupiais e, no segundo, os responsáveis por algumas doenças de aves (FLINT et al., 2000).

A partícula viral apresenta um tamanho médio de 70 - 90nm com capsídeo de morfologia icosaédrica, constituído por 252 capsômeros. Destes, 240 são *hexons* e 12 são *pentons*. Cada *penton* possui uma base circundada por 5 *hexons* e a partir desta base, projeta-se a fibra (Figura 3). O material genético viral é composto por DNA de filamento duplo associado a proteínas (FLINT et al., 2000).

Estes vírus apresentam uma grande variabilidade genética, o que possibilitou a sua classificação em espécies e sorotipos (LEES, 2000). Os determinantes antigênicos, importantes para a caracterização sorológica, estão localizados no *hexon* e na fibra. Na superfície interna do *hexon* situa-se o determinante alfa, que é o antígeno gênero-específico comum, a todos os membros do mesmo gênero. O determinante *epsilon* do *hexon* e o *gamma* da fibra caracterizam os sorotipos (FLINT et al., 2000).



**FIGURA 3-** Representação esquemática da morfologia e estrutura do adenovírus.

Fonte: [www.nobel.se/medicine/education/poster/1993/genes-in-pieces.html](http://www.nobel.se/medicine/education/poster/1993/genes-in-pieces.html).

Em 1953, Rowe et al., caracterizaram os adenovírus como agentes capazes de ocasionar degeneração de células epiteliais. Atualmente, os adenovírus humanos são reconhecidos como agentes etiológicos causadores de diversas doenças, como infecções gastrointestinais, urinárias, do trato respiratório e do globo ocular. Os principais modos de infecção se dão pela via respiratória (pessoa-pessoa e ar através da inalação de aerossóis) e pela via fecal-oral (pessoa-pessoa, ingestão de água e alimentos contaminados) (FIELDS et al., 1996; KIDD et al., 1996; ALLARD et al., 2001; AVELLÓN et al., 2001). As infecções por adenovírus ocorrem durante o ano com pequena ou nenhuma variação sazonal de liberação destes vírus para o meio ambiente (CHAPRON et al., 2000).

Atualmente, existem 51 sorotipos distintos descritos, os quais encontram-se agrupados em seis subgêneros (A - F) (LEES, 2000; ALLARD et al., 2001; AVELLÓN et al., 2001).

Os membros do subgênero A, sorotipos 12, 18 e 31, causam infecções respiratórias e gastroenterites em crianças menores de um ano de idade. O subgênero B está dividido em dois grupos pela análise de restrição do DNA: na classe B:1 encontram-se os sorotipos 3, 7, 14, 16 e 21, que são associados predominantemente às infecções respiratórias; na classe B:2, encontram-se os sorotipos 11, 34 e 35, sendo bastante próximos geneticamente e causam infecções renais e do trato urinário (WADEL, 1984).

Os sorotipos 1, 2, 5 e 6 pertencem ao subgênero C, são considerados endêmicos, infectam as adenóides e tonsilas, podendo ser isolados de fezes de indivíduos assintomáticos por longos períodos. Os adenovírus pertencentes aos subgêneros B e C têm mostrado uma grande variabilidade genética pela análise de

restrição do DNA (ALLARD et al., 1990; ELNIFRO et al., 2000). O subgênero D apresenta a maior variabilidade genética entre os adenovírus humanos, sendo a maioria dos sorotipos isolados de indivíduos com infecções assintomáticas. Alguns sorotipos do subgênero D, como 8, 10 e 19 estão associados à ceratoconjuntivite epidêmica. O subgênero E possui um único membro, o Ad4, que é responsável por surtos epidêmicos de infecções respiratórias em recrutas militares e predomina na população adulta. Os membros do subgênero F (Ad40 e Ad41) (adenovírus entéricos) são descritos como sendo responsáveis por 10% das gastroenterites infantis agudas e o segundo vírus em importância na etiologia desta doença, depois dos rotavírus. Estes diferem dos outros sorotipos por apresentarem duas fibras distintas e por serem de cultivo fastidioso (PINTÓ et al., 1995; MEDEIROS et al., 2001; SOARES, 2002).

Os sintomas clínicos em crianças incluem diarreia, vômito e febre. Em comparação com as infecções causadas por rotavírus, os adenovírus entéricos geralmente causam diarreia menos severa, porém por um período mais prolongado, podendo persistir por semanas. Estudos sorológicos indicam que 50% das crianças mais velhas e adultos jovens apresentam imunidade à doença (LEES, 2000).

Os adenovírus entéricos e os não entéricos, responsáveis por infecções respiratórias e do globo ocular, podem ser isolados nas fezes, sendo assim detectados em esgotos, rios, mares e moluscos (GIRONES et al., 1995; PINA et al., 1998; LEES, 2000).

Os adenovírus entéricos foram primeiramente reconhecidos, em 1975, através da técnica de microscopia eletrônica. Seu caráter fastidioso foi prontamente reconhecido quando mostraram dificuldades em propagar-se em linhagens estabelecidas de células humanas (UHNOO et al., 1984).

Assim como os demais vírus entéricos, os AdVs entéricos apresentam estabilidade à ação de agentes químicos, como o cloro e físicos como a radiação UV; bem como condições diversas de pH. Essas características possibilitam sua permanência no meio ambiente por longos períodos (PUIG et al., 1994; PINA et al., 1998; JIANG et al., 2001). Os Ad40 e Ad41, também apresentam certa resistência aos estágios primário e secundário de tratamento de águas de esgoto, o que aumenta ainda mais o risco da população ser contaminada por estes vírus (ENRIQUEZ et al., 1995; REYNOLDS et al., 1998).

A escolha deste agente viral para o estudo no presente trabalho de dissertação foi baseada no risco que ele apresenta à saúde pública, quando presente no meio ambiente, e a sua grande estabilidade e resistência a condições adversas (GERBA et al., 1990; PUIG et al., 1994; PINA et al., 1998). Além disso, muitos pesquisadores têm sugerido a utilização dos adenovírus como um indicador de contaminação viral humana no meio ambiente, visto que esses vírus são detectados, também, quando há a presença de enterovírus e/ou o vírus da hepatite A (HAV) (PUIG et al., 1994; PINA et al., 1998; CHO et al., 2000; MUNIAIN-MUJICA et al., 2000; 2002; HERNROTH et al., 2002; GIRONES, 2002).

O Ad5 foi selecionado como vírus padrão neste trabalho, com base na sua facilidade de multiplicar-se numa linhagem celular estabelecida, células HEp-2, o que facilitou sua multiplicação nas condições do laboratório.

## 5- HÁBITO ALIMENTAR E CAPACIDADE DE BIOACUMULAÇÃO DOS MOLUSCOS

As ostras são organismos bivalves que se alimentam de partículas em suspensão na água. O alimento provém de um fluxo de água, que passa através da cavidade do manto, pelas brânquias ciliadas. Estas são alargadas e pregueadas e funcionam como um filtro, concentrando partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal (PEARSE et al, 1987; WARD, 1996).

Devido ao seu hábito alimentar filtrante, os moluscos bivalves podem adsorver e bioacumular em seus tecidos, diversos patógenos humanos eventualmente presentes nas águas de cultivo, tais como vírus entéricos, bactérias, protozoários e helmintos (AHMED, 1992; NATIONAL ADVISORY COMMITTEE, 1992; JAYKUS et al., 1996) e também contaminantes químicos tais como: mercúrio, ferro, chumbo, cobre, cádmio, cromo, manganês, organoclorados e hidrocarbonetos de petróleo, dependendo da qualidade da água onde os mesmos se encontram (LEE, KRUSE, WASSERMANN, 1994 ; SHIM et al., 1998; ST-JEAN et al., 1999).

Devido a esta característica de bioacumulação, os moluscos bivalves recebem o nome de “indicadores” ou “monitores” de contaminação ambiental, utilizados como importante ferramenta na identificação de diversos sintomas um ambiente costeiro ou estuarino em estresse (SMAAL & WIDDOWS, 1994).

O consumo de moluscos contaminados com patógenos provenientes de fezes humanas representa um risco à saúde pública (SCHWAB et al., 1995).

Estudos sobre bioacumulação de partículas virais em bivalves demonstrou que, após 6 horas de imersão em água contendo  $8 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^7$  partículas de

adenovírus entérico e rotavírus humano por litro, respectivamente, entre 25 e 35% dos vírus eram adsorvidos pelos tecidos destes bivalves (BOSCH, PINTO, ABAD, 1995; MUNIAIN-MUJICA et al., 2002). A maioria dos moluscos bivalves é capaz de bioacumular de 3 a 100 vezes mais partículas virais em relação à concentração destas partículas nas águas circundantes (JAYKUS, DE LEON, SOBSEY, 1993; MUNIAIN-MUJICA et al., 2002).

## **6- LEGISLAÇÃO VIGENTE EM RELAÇÃO AOS SISTEMAS DE CULTIVO DE MOLUSCOS**

As normas para a avaliação da qualidade sanitária dos frutos do mar cultivados para o consumo são asseguradas por métodos baseados principalmente no monitoramento dos níveis de coliformes fecais que estão presentes nas águas de cultivo e/ou dos próprios animais (GAMA et al., 1989; REGAN, MARGOLIN, WATKINS, 1993). Dados da nova legislação (CONAMA-20, 20/12/2000), dispensam a avaliação de coliformes fecais para moluscos, exigindo a análise de presença ou ausência de *Salmonella* sp e *Streptococcus* coagulase positivo. Os níveis de coliformes fecais continuam exigidos somente para as águas de cultivo.

Entretanto, como tais microrganismos são facilmente inativados pelos procedimentos de tratamento de água ou efluentes, um número aceitável de enterobactérias não assegura a inexistência de outros patógenos resistentes a inativação, tais como os vírus entéricos (SATO et al., 1992; LEES, 2000).

Para serem comercializadas para outros estados, as ostras produzidas devem ter o certificado de inspeção sanitária (Serviço de Inspeção Federal = SIF), emitido pelo

Serviço de Inspeção de Produto Animal (SERPA) do Ministério da Agricultura. A maioria dos maricultores não possui este registro exigido para comercialização de qualquer produto de origem animal e que funciona como um certificado de qualidade, além de informar a procedência dos produtos vendidos. Para conseguí-lo o produtor precisa seguir uma série de determinações do Ministério da Agricultura, que vão desde medidas e gabaritos para construção das instalações até o tipo de roupa utilizada. O SIF é uma garantia para o consumidor e sem ele é impossível comercializar ostras e mexilhões para outras regiões. Além disso, um local para beneficiamento dos moluscos também é requerido para obter o carimbo do SIF.

## **7- METODOLOGIAS DISPONÍVEIS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS EM MOLUSCOS**

As metodologias desenvolvidas para a detecção viral em amostras clínicas e ambientais refletem a evolução do conhecimento na área de virologia, que começou com o isolamento dos vírus por indução da doença em animais de laboratório, detecção do efeito citopático viral em culturas celulares, evoluindo para metodologias imunológicas e moleculares que detectam o material genético viral e identificam as espécies circulantes, através de análise de restrição (RFLP) (METCALF et al., 1995; ELNIFRO et al., 2000; ALLARD et al., 2001; SOARES et al., 2002).

Quando presentes no meio ambiente, os vírus encontram-se em pequenas quantidades ou muito dispersos. Moluscos contaminados por vírus entéricos podem conter de 0,2 a 224 partículas em seus tecidos (SHIEH et al., 1999; LEGEAY et al., 2000; SCIPIONE et al., 2000). Durante os últimos 20 anos, vêm sendo desenvolvidos

vários métodos de concentração e de extração de vírus presentes em águas, alimentos de maneira geral e tecidos de moluscos contaminados, com o objetivo de aumentar a eficácia da recuperação viral e da detecção de quantidades virais mínimas, além de minimizar o efeito citotóxico quando a cultura celular *in vitro* é requerida para o isolamento e a caracterização ou eliminar inibidores de reações enzimáticas quando as técnicas moleculares são escolhidas para esta finalidade (LEWIS & METCALF, 1988; SHIEH et al., 1999; BARARDI et al., 1999; LEGEAY et al., 2000; SANTOS et al., 2001; SANTOS et al., 2002).

Estes métodos envolvem uma combinação de etapas consecutivas a fim de separar e depois eluir os vírus dos tecidos dos moluscos, concentrando-os em pequenos volumes, passíveis de serem processados para identificação viral (LEWIS & METCALF, 1988; BOUCHRITI & GOYAL, 1993; JAIKUS et al., 1996; PINA et al., 1998; SHIEH et al., 1999; LE GUYADER, 2000). Independente da metodologia a ser utilizada, nenhuma delas é igualmente eficaz para produtos marinhos de diferentes lugares geográficos, sugerindo que os ensaios devem ser previamente padronizados em condições laboratoriais, antes de serem aplicados para amostras de campo (LEES, 2000; SCIPIONE et al., 2000).

Os métodos clássicos para a detecção viral em amostras ambientais são baseados no isolamento dos agentes virais em culturas celulares. Por meio destes métodos o número das partículas virais é aumentado pela multiplicação e a detecção é possível pelo desenvolvimento de um efeito citopático característico da infecção viral, o qual é visualizado em microscópio ótico (REYNOLDS et al., 1996). Estes métodos são caros e leva-se muito tempo para chegar ao resultado, podendo ocorrer falso-positivos devido à presença de substâncias citotóxicas como os ácidos húmicos, metais pesados

e íons de ferro, presentes nas amostras ambientais. Essas substâncias, por promoverem a lise celular, podem interferir na especificidade dos resultados (MOENPHO et al., 2001; REYNOLDS et al., 2001).

A existência de uma grande diversidade de vírus presentes nas amostras ambientais também é um fator que pode dificultar a detecção de determinados grupos de vírus, uma vez que os menos fastidiosos produzem alterações morfológicas na monocamada celular mais rapidamente do que os mais fastidiosos (REYNOLDS et al., 1996; 2001).

Métodos moleculares, tais como a hibridização molecular e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram desenvolvidos visando à detecção de vírus entéricos em amostras clínicas e ambientais (SCHWAB et al., 2001). Estas técnicas apresentam vantagens em relação às tradicionais por sua alta sensibilidade, simplicidade e rapidez (ALLARD et al., 1994; GREEN & LEWIS, 1999; SHIEH et al., 1999; LEGEAY et al., 2000; LEES, 2000; LE GUYADER, 2000).

A amplificação gênica pela reação de PCR permite a detecção de pequenas quantidades de seqüências de DNA ou RNA, usualmente encontradas em amostras ambientais. Ela tornou-se imprescindível para a detecção de vírus contaminantes destas amostras e rotineiramente difíceis de identificar como o vírus da hepatite A, vírus Norwalk ou rotavírus (GREEN & LEWIS, 1999; SHIEH et al., 1999; LEGEAY et al., 2000; LEES, 2000).

O diagnóstico das infecções causadas pelos NLVs é complicado, principalmente, pelo fato desses vírus não serem adaptados ao cultivo celular *in vitro*. A microscopia eletrônica e a eletromicroscopia imunológica têm sido usadas no

diagnóstico das infecções por NLVs, mas possuem baixa especificidade e sensibilidade (ANDO, 1995; IRITANI, 2000; LEES, 2000; CDC, 2001).

Recentemente, a clonagem e o sequenciamento do genoma do vírus Norwalk e Sounthanpton, facilitou o diagnóstico dos NLVs por permitir a construção de iniciadores genéticos, que facilitam as reações de transcrição reversa e amplificação gênica (RT-PCR) (IRITANI, 2000; LE GUYADER, 2000).

A utilização de conjuntos de iniciadores que amplificam a maior parte das linhagens dos genogrupos G1 e G2, combinada com a hibridização molecular, consegue detectar a maioria das linhagens dos NLVs e torna a PCR uma importante ferramenta para o diagnóstico destes vírus tanto em ostras quanto em fezes (ANDO, 1995; IRITANI, 2000).

Com relação aos adenovírus, o uso da reação de PCR para sua detecção vem sendo realizada por meio da amplificação de seqüências nucleotídicas correspondentes à região que codifica a proteína *hexon*, extremamente conservada em todos os subgêneros de adenovírus. Os iniciadores externos hexAA1885 e hexAA1913 ou internos nexAA1893 e nexAA1905, propostos por ALLARD (1990 e 1992) têm se mostrado adequado para tal amplificação.

Apesar de todas as suas vantagens, a sensibilidade da reação de PCR pode ser reduzida consideravelmente pela presença de substâncias, tais como proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e carboidratos, bem como compostos inorgânicos e íons de ferro e alumínio (SHIEH et al., 1997; 1999). Estas substâncias inibem a reação de PCR por inibirem a polimerase, por seqüestrarem íons bivalentes do meio, por inibirem a incorporação de nucleotídeos, entre outros, e são comuns na carne dos moluscos que apresenta uma matriz química muito complexa, podendo variar geograficamente e em

concentração (HURTS et al., 1997; SHIEH et al., 1999; ARNAL et al., 1999). Nucleases e proteases também podem interferir na reação, degradando o genoma do vírus antes que ele seja amplificado (SCHWAB, LEON, SOBSEY, 1996; SHIEH et al., 1999).

A aplicação da tecnologia de PCR em amostras ambientais complexas requer uma extensa purificação a ser empregada para a detecção eficiente dos vírus. Como resultado, um grande número de métodos tem sido publicados nos últimos anos que utilizam uma variedade de técnicas, tais como precipitação seletiva, antígeno de captura, dissecação dos tecidos dos moluscos, extração com solvente e cromatografia em coluna (BOUCHRITI & GOYAL, 1993; DIX & JAYKUS, 1998; PINA et al., 1998; SHIEH et al., 1999; LEGEAY et al., 2000; LE GUYADER, 2000; MUNIAIN-MUJIKI et al., 2000).

Apesar destas desvantagens, o PCR é um método atraente para a rotina de monitoramento de vírus entéricos humanos presentes nos frutos do mar, já que uma vez padronizado, é mais rápido, simples e menos dispendioso que os métodos de cultura celular (ABBASZADEGAN et al., 1999; STRAUB et al., 1994; PINA et al., 1998; LEES, 2000; SANTOS et al., 2001; COELHO et al., 2003).

Diversos pesquisadores vêm desenvolvendo tecnologias alternativas, que possam melhorar a eficácia da análise de contaminantes virais nas amostras ambientais, associando a PCR à cultura celular (ICC-PCR). A grande vantagem desta metodologia é o aumento da sensibilidade da reação de PCR, já que uma vez que as amostras ambientais passam pela cultura de células, a concentração das partículas virais infectantes é aumentada e a quantidade de inibidores diminuída. Em comparação com a cultura celular sozinha, a presença de partículas virais infectantes pode ser

confirmada por ICC-PCR em três dias ao invés de uma semana (REYNOLDS et al., 2001).

Os vírus NLV foram escolhidos para a realização deste trabalho, principalmente, pela sua ampla distribuição e importante relação com surtos de gastroenterite, associados ao consumo de moluscos. Os AdVs foram escolhidos para serem utilizados como um modelo viral no monitoramento das amostras ambientais, principalmente, devido a sua resistência no meio ambiente e ampla distribuição, já que como citado anteriormente, mesmo os adenovírus respiratórios podem ser liberados juntamente com as fezes e contaminar o meio ambiente.

**OBJETIVOS**

---

## 1- GERAIS

- Padronizar e aplicar a técnica de amplificação gênica (PCR) para a detecção dos vírus Norwalk-like (NLVs) em ostras experimentalmente inoculadas.
- Padronizar as técnicas de PCR, *nested*-PCR e ICC-PCR para a detecção dos adenovírus (AdV), em ostras experimentalmente inoculadas.
- Monitorar a contaminação com AdV em ostras cultivadas em três fazendas de Florianópolis.

## 2- ESPECÍFICOS

- Otimizar as reações de amplificação gênica precedidas de transcrição reversa (RT-PCR) para os vírus NLVs, utilizando amostras de fezes humanas contaminadas pelos NLVs.
- Verificar os limites de sensibilidade de detecção dos vírus NLVs, em extratos de ostras artificialmente inoculadas com estes vírus.
- Otimizar as reações de PCR e *nested*-PCR para os AdV, utilizando suspensões celulares infectadas por estes vírus como controle positivo, bem como ostras experimentalmente inoculadas.

- Verificar os limites de sensibilidade das reações de PCR e *nested*-PCR, utilizando suspensões de AdV e extratos de ostras experimentalmente inoculadas.
  
- Padronizar a técnica de ICC-PCR para AdV em ostras experimentalmente inoculadas e de cultivo.
  
- Coletar ostras durante 7 meses (Abril – Outubro de 2002) em três pontos de cultivo de Florianópolis, e verificar a presença de AdV através das técnicas de PCR, *nested* -PCR e ICC-PCR.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 1- MATERIAIS BIOLÓGICOS

### 1.1- Vírus

#### □ Norwalk-like (NLV)

As amostras de fezes foram obtidas a partir de um estoque de fezes de indivíduos infectados pelos vírus Norwalk-like. As mesmas foram gentilmente cedidas pelo setor de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, SP e posteriormente armazenadas a -80°C. Essas amostras eram comprovadamente positivas para vírus do gênero Norwalk-like, pertencentes ao genogrupo G2, da família Caliciviridae, conforme confirmado por microscopia eletrônica.

#### □ Adenovírus

O adenovírus humano sorotipo 5 (Ad5), do genogrupo C, foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Dolores U. Menhert do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP, e utilizado neste trabalho como vírus-padrão em todos os ensaios, já que é adaptado ao cultivo celular *in vitro*.

## 1.2 Ostras

As ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram adquiridas diretamente com os produtores de Florianópolis-SC e utilizadas para a infecção experimental e análise de campo.

### 1.2.1- Amostras ambientais

Um total de 20 amostras de ostras coletadas durante sete meses em três pontos de cultivo no Norte da Ilha, em Florianópolis, foi utilizado na avaliação da metodologia proposta para a detecção de adenovírus.

Doze ostras de cada local foram coletadas mensalmente no período de abril a outubro de 2002, sempre na primeira quinzena do mês e no horário entre oito e nove horas da manhã, com o objetivo de minimizar possíveis variações na amostra. No mês de julho não foi possível coletar a amostra no sítio 3.

Estas amostras foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas em caixa térmica durante o transporte até o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC. Concomitantemente, foi colhida em frascos de vidro estéreis, uma amostra de aproximadamente 100 ml de água do mar, em cada ponto de cultivo, durante o período de junho a outubro de 2002, para a determinação do número de coliformes fecais e totais. Estas amostras foram transportadas ao LVA juntamente com as amostras de ostras.

As amostras de água foram analisadas pela equipe do Laboratório de Virologia Aplicada para verificar a presença de coliformes fecais, segundo metodologia descrita

por PEELER, HOWGHTBY, RAINOSEK (1999), obtendo os valores em número mais provável (NMP).

## **2- CULTIVO DE CÉLULAS HEP-2**

Células da linhagem estabelecida de carcinoma de orofaringe humano, HEp-2, permissivas à infecção *in vitro* pelos adenovírus (com exceção dos entéricos), foram mantidas em garrafas de 75cm<sup>2</sup>, contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's (MEM, Sigma), adicionado de bicarbonato de sódio, antibióticos/antifúngico: penicilina G e sulfato de estreptomicina/anfotericina B (Gibco-BRL) nas concentrações finais de 100U/mL, 100µg/mL e 0,25 µg/mL, respectivamente e soro fetal bovino à 10% (SFB, Gibco-BRL). Para o subcultivo, a monocamada celular foi lavada 2x com tampão salina fosfato (PBS) esterilizado (NaCl 150mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM; e KCl 27mM pH 7,2), recebendo em seguida tratamento enzimático com solução a 0,05% de tripsina (1:250, Sigma) preparada em solução contendo NaCl 0,8%; KCl 0,04%, dextrose 0,1%; NaHCO<sub>3</sub> 0,058%, EDTA 0,02% e vermelho de fenol 0,045%. Após o desprendimento da monocamada celular, as células foram ressuspensas em 20 ml de meio MEM com 10% SBF. Em seguida, as suspensões foram transferidas para garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas à 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>.

### **3- PREPARO DAS SUSPENSÕES DE ADENOVÍRUS PADRÃO**

Para produção dos estoques virais, as células HEp-2 foram previamente cultivadas conforme descrito no item 2 e, ao atingirem uma monocamada confluyente, foram lavadas 2X com PBS, pH 7,2. As células receberam 2 ml de um inóculo viral já existente e foram incubadas por 1h à 37°C, em atmosfera de CO<sub>2</sub>, a fim de propiciar a adsorção das partículas virais às células. Após este período, o inóculo foi aspirado e as células adicionadas de meio MEM com 1% SBF e mantidas sob as mesmas condições físicas acima mencionadas (BIRCH et al., 1983).

Após visualização do efeito citopático (ECP) em 100% das células infectadas, estas culturas foram congeladas a -80°C e descongeladas a 37°C, por 3X, com a finalidade de romper as membranas celulares restantes. O processo de passagem viral foi continuado a fim de aumentar o título viral, diminuindo o tempo necessário de incubação dos vírus nas células. Neste momento as suspensões de Ad5 padrão foram aliqüotadas e estocadas a -80°C.

### **4- PREPARO DAS SUSPENSÕES DE FEZES**

As suspensões de fezes foram preparadas em tampão salina-fosfato (PBS pH 7,2), na diluição final de 5%.

## 5- TITULAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ADENOVÍRUS PADRÃO

O título infeccioso de uma suspensão viral corresponde ao número de partículas virais por unidade de volume, capazes de infectar células permissivas.

O título infeccioso do estoque viral de adenovírus padrão (Ad5), produzido neste trabalho, foi determinado através de duas metodologias:

### 5.1- Método das diluições-limite (TCID<sub>50</sub>)

O título infeccioso foi quantificado pelo valor recíproco da diluição dos vírus que teve a capacidade de infectar 50% das células hospedeiras inoculadas, sendo expresso como a dose infectante a 50% do tecido celular (TCID<sub>50</sub>) por ml. A metodologia utilizada para estimar o TCID<sub>50</sub> foi aquela preconizada por REED & MUENCH (1938). O TCID<sub>50</sub> não revela quantas unidades infecciosas podem estar presentes na amostra, mas somente se esta dose ou diluição produzirá ECP em cerca de 50% das unidades experimentais (no caso, cada cavidade).

A partir de uma suspensão do estoque viral, foi preparada uma série de diluições na base de 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-11}$ ), em tubos de microtitulação, com meio MEM sem SFB (225µL de meio MEM + 25µL de suspensão viral). Após, 200µl destas diluições foram adicionados ao tapete celular, previamente formado em placas de 96 cavidades, depois da aspiração do meio de cultura (1% de SBF + antibiótico/antifúngico). A placa, foi então, incubada a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>, durante 7 dias,

(=4 ciclos de multiplicação do Ad5), e foi observada diariamente ao microscópio invertido.

Em cada diluição foram contadas as cavidades infectadas, com efeito citopático (positivas), e não infectadas, sem efeito citopático (negativas), e calculadas as porcentagens de cavidades infectadas para cada diluição. O título da suspensão viral foi então determinado matematicamente através do método de Reed-Muench, obtendo-se valores em TCID<sub>50</sub>.

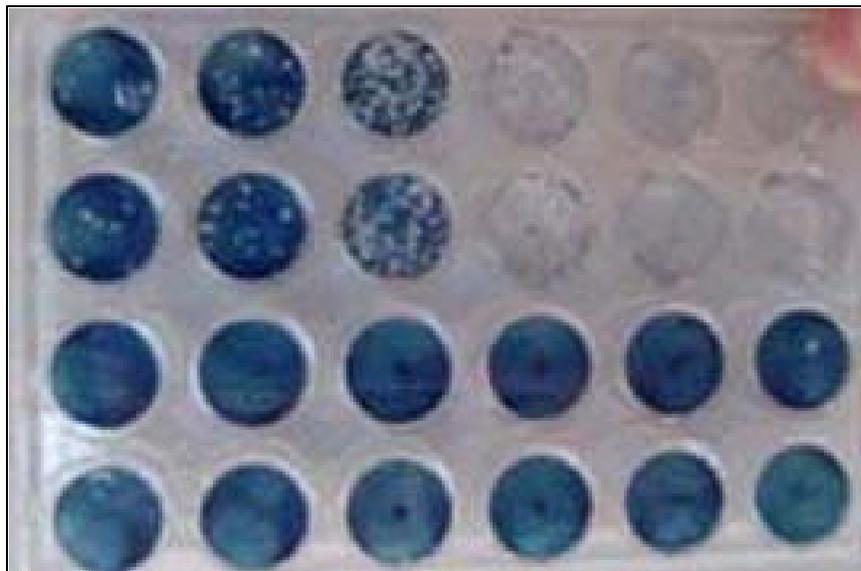
## **5.2- Método de contagem de placas de lise (BURLINSON et al., 1992; KINGCHINGTON et al., 1995).**

Células HEp-2, na densidade de  $2 \times 10^5$  células/ml, foram cultivadas em placas de 24 cavidades (NUNC) com meio MEM suplementado de 5% de SBF, até atingirem confluência. A suspensão foi diluída de forma seriada de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em meio MEM. O meio foi aspirado e 250µL das diferentes diluições foram adicionados a cada cavidade. As placas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, por 1h. Após este período, o inóculo foi removido e adicionou-se 1 ml da seguinte solução: meio MEM 2X + solução aquosa 1,5% de carboximetilcelulose na proporção de 1:1. As placas foram então incubadas por 24 h sob as mesmas condições. Após este período, o meio foi aspirado e as células fixadas e coradas pela adição de 250µl do corante preto de naftaleno (Sigma) (0,1% de corante em solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v), pH 2,3-2,5) durante 30 min à temperatura ambiente, sob agitação. Após este período, o corante foi aspirado e as células deixadas para secar.

Para calcular o título foram escolhidas diluições que apresentavam menor número de focos de infecção, caracterizados por áreas claras de lise celular, chamadas de placas (Figura 4). Estas foram contadas com ajuda de microscópio estereoscópico.

Segundo BURLINSON et al. (1992), o título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placa/ml (PFU/ml) e, portanto de partículas virais, já que teoricamente, cada placa é iniciada pela infecção de um único vírus. Sendo assim o título viral foi calculado através da seguinte fórmula:

**N° de placas x recíproca da diluição x recíproca do volume em ml.**



**Figura 4:** Representação da placa de 24 cavidades utilizada no ensaio de formação de placas de lise, para titulação do Ad5 padrão.

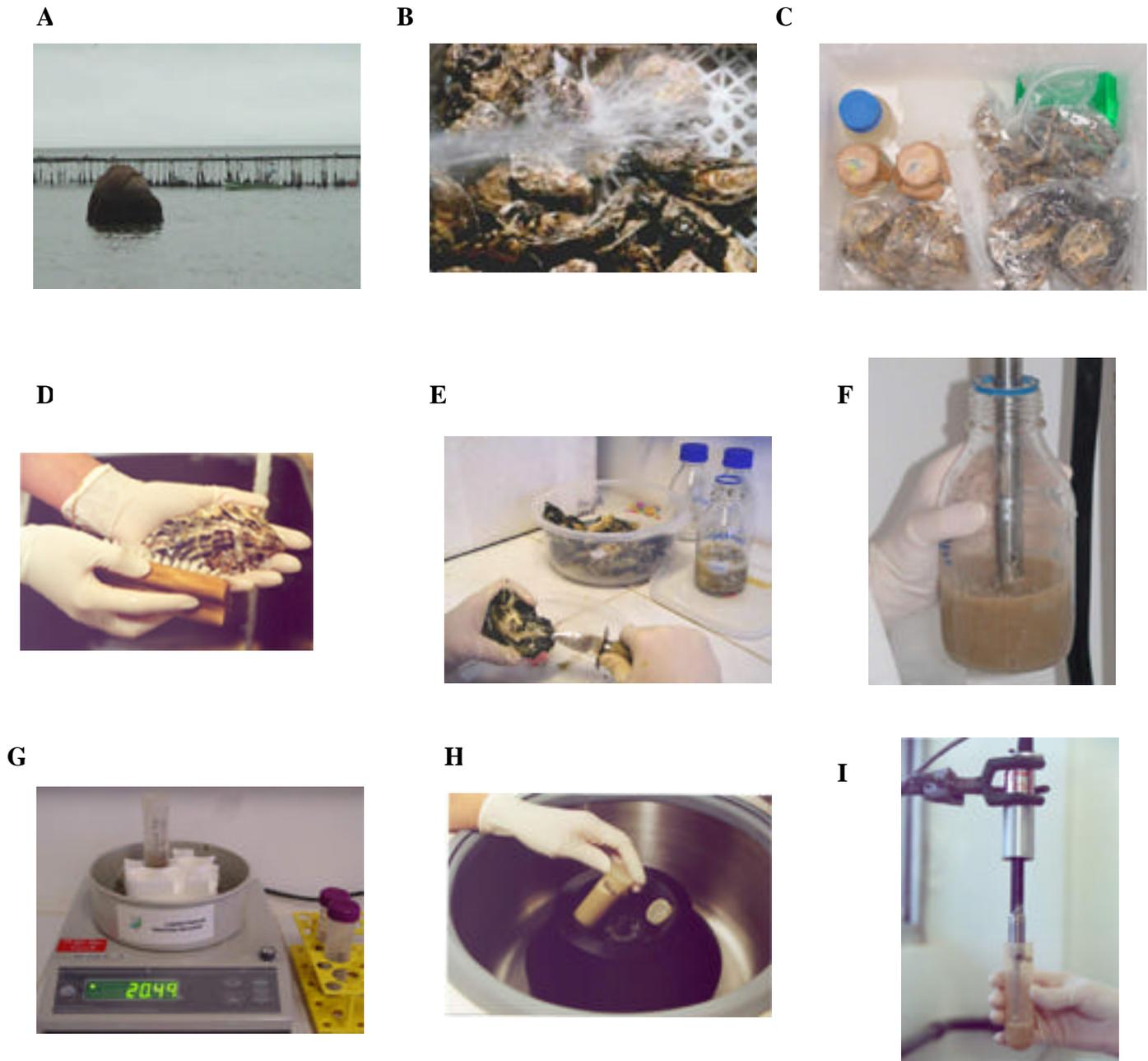
## **6- PREPARAÇÃO DE EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS (BARARDI et al., 1999; SANTOS et al., 2001).**

Este processo foi realizado conforme descrito por Barardi, 1999 e as modificações apresentadas por Santos, 2001 e teve como finalidade liberar os vírus adsorvidos nos tecidos das ostras para posteriormente, concentrá-los em volumes menores.

Os tecidos de 12 ostras foram macerados com o auxílio de um homogeneizador Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Labortechnik), e 20g do homogeneizado, que corresponde a uma amostra representativa. Utilizou-se também 20g de extrato tissular reconhecidamente não infectado, que foi inoculado com  $1,2 \times 10^5$  PFU/ml da suspensão de Ad5 padrão ou 60 $\mu$ l da suspensão de fezes de NLV a 5%, que foi utilizado como controle positivo e denominado: extrato de ostras experimentalmente inoculado.

Cada 20g de extrato foi homogeneizado com o auxílio do mesmo homogeneizador descrito acima durante 30seg a 24.000 rotações/min em presença de 10% (v/v) de tampão triptose-fosfato (TPB), (TPB 100% contém 20 g de triptose; 2,0g de glicose; 5,0 g de NaCl e 2,5g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,3) preparado em glicina 0,05M, pH 9,0, que atua como eluente dos vírus. O homogeneizado foi deixado sob agitação suave a 4°C durante 30 minutos e, posteriormente, centrifugado a 10.000Xg, durante 30 min, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo os vírus foi precipitado em presença de polietileno glicol 6.000 (PEG-Sigma)) a 8% (p/v), preparado em TPB 10% e mantido sob agitação durante 2h, a 4°C. Posteriormente a esse período, a suspensão foi centrifugada durante 20 min, a 10.000Xg, a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em

5ml de tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 9,0. Esta suspensão foi submetida a um tratamento por ultra-som no aparelho Sonic Dismembrator Modelo 60 (Fisher Scientific) para completar o desprendimento das partículas virais ainda adsorvidas ao co-precipitado de PEG. Os extratos foram transferidos para tubos estéreis, onde o pH foi reajustado para 7,5. As amostras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização nos ensaios de ICC-PCR, PCR e *nested*-PCR. O extrato de ostras experimentalmente inoculadas foi utilizado na padronização destes ensaios e na verificação do limite de sensibilidade (Figura 5).



**Figura 5:** Ilustração do procedimento de preparação dos extratos de ostras. (A) Local de cultivo (B) Lavagem das ostras (C) Transporte em caixa térmica (D) Limpeza e assepsia das valvas (E) Abertura das valvas com auxílio da faca estéril (F) Homogeneização dos tecidos das 12 ostras de cada local (G) Pesagem das 20g (H) Centrifugação (I) Dispersão das partículas virais por ultrassom.

## 7- EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

### 7.1- Extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico do DNA viral a partir das suspensões de adenovírus padrão

A extração do DNA de adenovírus a partir das suspensões de adenovírus padrão foi realizada segundo metodologia proposta por SAMBROOK & RUSSELL (2001), com algumas modificações.

Alíquotas da suspensão viral foram distribuídas em microtubos contendo igual volume de Freon® 113 (triclorotrifluoretano, Aldrich). As amostras foram agitadas vigorosamente durante 30seg com auxílio de um agitador de tubos e centrifugadas a 12.000Xg por 5min, à 4°C. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo, acrescida de dodecil sulfato de sódio 1% (p/v)(SDS, Gibco-BRL) e incubada a 37°C, durante 30min. Após incubação, foram acrescentados às amostras 500µl da mistura dos solventes orgânicos fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1. Estas foram agitadas por 30seg e centrifugadas como descrito acima. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescida de 500µl de clorofórmio a fim de retirar os traços de fenol restantes na amostra, agitada por 1 min e centrifugada a 12.000Xg por 5min, a 4°C. Para precipitação dos ácidos nucleicos, foram adicionados à fase aquosa acetato de sódio 3M pH 5,3 na concentração final de 0,3M e 2,5 volumes de etanol absoluto (Merck) mantido a -20°C. As amostras foram incubadas durante 2h à -20°C ou alternativamente, durante 1h a -80°C. Em seguida realizou-se a precipitação, as amostras de DNA foram centrifugadas a 12.000Xg durante 20min, a 4°C. A fase aquosa foi descartada, cada amostra foi acrescida de 2

volumes de etanol 75%, mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$ , homogeneizada levemente e centrifugada a  $12.000\times g$ , durante 5min, a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi novamente descartada, o tubo vertido sob o papel absorvente e o DNA foi seco ao ar. Foram adicionados ao precipitado  $50\mu\text{l}$  de água Milli-Q autoclavada e o tubo foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

## **7.2- Extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico do DNA viral de AdV a partir dos extratos de ostras**

O procedimento de extração do DNA viral a partir dos extratos tissulares experimentalmente inoculados e de amostras ambientais foi baseado segundo descrito por ATMAR et al. (1993); LEES et al. (1994); BARARDI et al. (1999) e SANTOS et al. (2001). Aliquotas de  $500\mu\text{l}$  de extrato de ostras receberam o mesmo volume de Freon 113, foram agitadas por 1min e, em seguida, centrifugadas a  $12.000\times g$ , 5min,  $4^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e tratada durante 30min a  $37^{\circ}\text{C}$  com  $400\mu\text{g}$  da enzima proteinase K (Gibco-BRL) juntamente com o tampão da enzima com a seguinte composição: Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 5mM; SDS 0,5% (p/v). Após este período, os tubos foram adicionados de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma) na concentração de 1,3 % (p/v) em presença de cloreto de sódio (Sigma) 0,4M, sendo as amostras incubadas a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30min. Após, realizou-se o procedimento de extração dos ácidos nucleicos com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e precipitação com etanol conforme descrito no item 7.1. Neste caso, o DNA foi dissolvido em  $500\mu\text{l}$  de água Milli-Q autoclavada. Os tubos foram estocados a  $20^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

### **7.3- Extração com Trizol<sup>®</sup> do RNA de NLVs a partir das suspensões de fezes**

Os RNAs virais foram extraídos sempre em duplicata, de acordo com as especificações do fabricante, com pequenas modificações: quinhentos microlitros de suspensão de fezes foram adicionados à igual volume de triclorotrifluoretano (Freon 113). As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um agitador de tubos e centrifugadas a 12.000Xg por 5 min à 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo limpo onde foi adicionado uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% (p/v), para obter uma concentração final do mesmo de 1%. As amostras foram incubadas a 37°C por 30min. Em seguida, foi adicionado o dobro do volume inicial da amostra de Trizol<sup>®</sup> (Sigma-BRL) a cada tubo. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (T.A.). Após a adição de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente por 15seg e incubados por 10min à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000Xg a 4°C por 15min. A fase orgânica contendo Trizol<sup>®</sup> foi desprezada e a fase aquosa transferida para outro tubo onde o ácido nucléico foi precipitado por adição de isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por 15seg e incubados por 10min à T.A.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000Xg a 4°C por 10min, o sobrenadante foi desprezado por inversão, e ao precipitado foi adicionado 1ml de etanol a 70% gelado. Com o auxílio de um agitador de tubos, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12.000Xg a 4°C por 5min. O sobrenadante foi

desprezado e o RNA seco ao ar. Em cada tubo foram adicionados 50µl de água tratada, livre de ribonucleases (DEPC). Os RNAs foram armazenados a -80°C até utilização.

#### **7.4- Extração com Trizol<sup>®</sup> do RNA viral de NLVs a partir dos extratos de ostras**

Após a clarificação com Freon 113, as amostras foram submetidas ao tratamento com proteinase K e, em seguida, com CTAB, conforme descrito no item 7.2. Após estes tratamentos, as amostras foram extraídas com Trizol<sup>®</sup> conforme descrito no item anterior. No final deste procedimento os RNAs foram dissolvidos em 500µl de água tratada, livre de ribonucleases (DEPC). Os RNAs foram armazenados a -80°C até utilização.

### **8- QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL**

A fim de quantificar o RNA total, obtido a partir das suspensões de fezes, após o processo de extração, a amostra foi analisada por espectrofotometria.

A concentração do RNA viral foi medida em espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) através da leitura da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, simultaneamente, para avaliar a quantidade de RNA obtido na extração. Desta forma, foi possível calcular a quantidade de RNA detectado no PCR (SAMBROOK et al., 2001).

## 9- ENSAIO DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DOS VÍRUS NORWALK-LIKE EXTRAÍDOS A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE FEZES E DO EXTRATO DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADO.

Foram selecionados para este trabalho, os iniciadores definidos por ANDO et al., (1995), tendo sido utilizados tanto na transcrição reversa (RT) quanto na PCR (SR33 e SR46). Estes iniciadores são baseados na sequência nucleotídica (Tabela 1) da região da RNA polimerase das diferentes linhagens dos NLVs, gerando um produto cuja seqüência é de 123pb.

**Tabela 1** - Sequência dos iniciadores específicos para amplificação dos NLVs do genogrupo G1 e G2.

| Iniciador | Identificação | Sequência (5' - 3')   | Localização |
|-----------|---------------|-----------------------|-------------|
| G-1, G-2  | SR33          | TGTCACGATCTCATCACC    | 4856-4876   |
| G-2       | SR46          | TGGAATTCCATCGCCCACTGG | 4754-4773   |

### 9.1- Transcrição reversa:

Foram testados dois protocolos para a realização da transcrição reversa, com diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> (protocolo 1: 3,0mM, protocolo 2: 4,5mM).

A mistura da reação de transcrição reversa (RT), foi realizada no fluxo laminar onde adicionou-se em um tubo (tubo 1) os seguintes reagentes: deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs, Gibco-BRL), 1,6mM, DTT (ditiotretol, Gibco-BRL), 2mM, MgCl<sub>2</sub> (Gibco-BRL) (dependendo do protocolo), iniciadores SR33 e SR46 (Gibco-BRL),

100pmoles de cada, enzima RT-MLV (Gibco-BRL), 40U, inibidor de RNase (Gibco-BRL), 5U e o  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma), 1mM. Em outro tubo separado (tubo 2), adicionou-se o tampão da enzima, a água DEPC (Gibco-BRL), e o Triton X-100 (Sigma). No ambiente destinado a manipulação de ácidos nucleicos, foi adicionado a este 2º tubo 5 $\mu$ l (0,95 $\mu$ g) de RNA, que foi desnaturado a 95° por 5min, no termociclador (Minicycler™, PTC-150-16 &-25, MJ Research). O tubo foi rapidamente transferido para o gelo por 1min. Após este período, foi centrifugado brevemente para coletar a amostra no fundo do tubo que foi adicionada aos outros reagentes que estavam no tubo 1. A reação de transcrição reversa, na qual o segmento de RNA foi transcrito à sequência de DNA complementar (cDNA), foi realizada a 37°C por 90min.

## **9.2- Determinação da concentração ideal dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR para NLVs**

A definição das concentrações salinas ideais da reação de PCR foi realizada utilizando o kit Opti-Prime™ (Stratagene Cloning Systems). Este kit consiste em tampões que apresentam três diferentes valores de pHs (pH 8,3; 8,8 e 9,2), duas concentrações finais de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM e 3,5mM) e duas concentrações finais de KCl (25mM e 75mM). Cada pH é combinado com diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> e KCl, perfazendo um total de doze concentrações salinas distintas nos tampões. A Tabela 2 mostra a composição de cada um destes componentes.

Foram colocados 42,5 $\mu$ l de água Milli-Q autoclavada em cada um dos 12 tubos contendo cada um dos 12 tampões, em seguida, adicionou-se dNTPs na concentração

de 200 $\mu$ M, 100pmoles de cada um dos iniciadores (SR33 e SR46), 2,5 U da enzima Taq-polimerase (Gibco-BRL) e 3 $\mu$ l do cDNA obtido através do protocolo 1 ou 2 de transcrição reversa. Os tubos foram colocados no termociclador que foi programado com os seguintes ciclos de acordo com ANDO et al., (1995): desnaturação a 94°C por 3min, 40 ciclos de amplificação com desnaturação por 1min a 94°C, anelamento por 1min e 30seg a 50°C, e extensão por 2min a 60°C, seguidos por uma extensão com incubação a 72°C por 7 min.

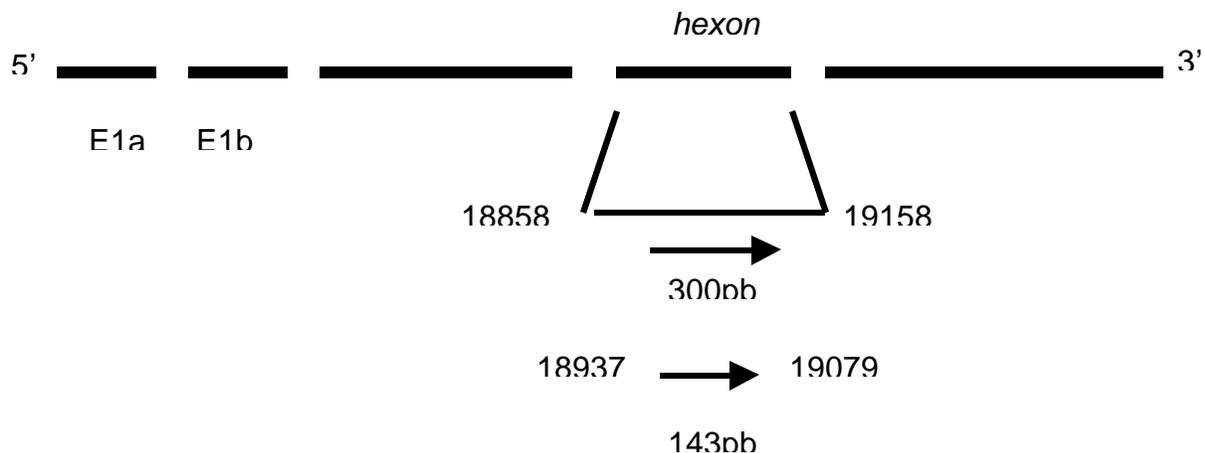
**Tabela 2-** Composição dos tampões do kit Opti-Prime™.

| Tampão | Tris-HCl<br>pH 8,3 | Tris-HCl<br>pH 8,8 | Tris-HCl<br>pH 9,2 | MgCl <sub>2</sub>   | KCl            |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| 1      | 5ml (100mM)        | -                  | -                  | 750 $\mu$ l (15mM)  | 12,5ml (250mM) |
| 2      | 5ml (100mM)        | -                  | -                  | 750 $\mu$ l (15mM)  | 37,5ml (750mM) |
| 3      | 5ml (100mM)        | -                  | -                  | 1750 $\mu$ l (35mM) | 12,5ml (250mM) |
| 4      | 5ml (100mM)        | -                  | -                  | 1750 $\mu$ l (35mM) | 37,5ml (750mM) |
| 5      | -                  | 5ml (100mM)        | -                  | 750 $\mu$ l (15mM)  | 12,5ml (250mM) |
| 6      | -                  | 5ml (100mM)        | -                  | 750 $\mu$ l (15mM)  | 37,5ml (750mM) |
| 7      | -                  | 5ml (100mM)        | -                  | 1750 $\mu$ l (35mM) | 12,5ml (250mM) |
| 8      | -                  | 5ml (100mM)        | -                  | 1750 $\mu$ l (35mM) | 37,5ml (750mM) |
| 9      | -                  | -                  | 5ml (100mM)        | 750 $\mu$ l (15mM)  | 12,5ml (250mM) |
| 10     | -                  | -                  | 5ml (100mM)        | 750 $\mu$ l (15mM)  | 37,5ml (750mM) |
| 11     | -                  | -                  | 5ml (100mM)        | 1750 $\mu$ l (35mM) | 12,5ml (250mM) |
| 12     | -                  | -                  | 5ml (100mM)        | 1750 $\mu$ l (35mM) | 37,5ml (750mM) |

## 10- ENSAIOS DE PCR E *NESTED*-PCR PARA A DETECÇÃO DO DNA DOS ADVS

Os ensaios de PCR e *nested*-PCR foram utilizados para a detecção do DNA dos AdVs extraídos a partir das suspensões Ad5 padrão e dos extratos de ostras experimentalmente inoculados. Primeiramente, os protocolos de PCR e *nested*-PCR, descritos por ALLARD et al., (1990), foram testados para o Ad5 padrão, e em seguida para os extratos de ostras experimentalmente inoculados e das amostras de campo.

Os iniciadores selecionados neste trabalho foram os descritos por ALLARD et al. (1992), que flanqueiam a seqüência completa do gene *hexon*, que codifica a proteína *hexon*, originando um produto de 300pb no PCR e de 143pb no *nested*-PCR (Figura 6).



- **hexAA 1885** (5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3')
- **hexAA 1913** (5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3')
- **nehexAA 1893** (5'-GCCACCGAGACGTA CTT CAGCCTG-3')
- **nehexAA 1905** (5'-TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC3')

**Figura 6-** Representação esquemática da região do gene *hexon* demonstrando os sítios específicos de anelamento dos iniciadores e suas respectivas seqüências.

### 10.1- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se concentrações de 82 pmoles e 85 pmoles dos iniciadores hexAA 1885 e hexAA 1913 (Invitrogen), respectivamente, que foram adicionados a uma mistura de reação contendo 1,5mM de  $MgCl_2$  (Biotools), tampão 1X da enzima (Biotools), 200 $\mu$ M de dNTPs (Gibco-BRL) e 2,5U de Taq-Polimerase (Biotools). Estes reagentes foram pipetados em fluxo laminar em um ambiente separado, livre de contaminação por ácidos nucleicos.

Na sala destinada à manipulação dos ácidos nucleicos, foram adicionados a este tubo de reação, 5 $\mu$ l de DNA viral.

A etapa de desnaturação das fitas de DNA realizou-se a 94°C por 1min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 56°C por 1min, e extensão a 72°C por 45seg. A extensão final ocorreu a 72°C por 7min.

Em todas as reações realizadas, utilizou-se água Milli-Q como controle negativo e Ad5 padrão como controle positivo.

### 10.2- Reação de *nested*-PCR

A amplificação das sequências nucleotídicas do DNA viral ocorreu em um meio composto por 85 pmoles de cada um dos iniciadores: nehexAA 1893 e nehexAA 1905 (Invitrogen), 1,5mM de  $MgCl_2$  (Biotools), tampão 1X da enzima (Biotools), 200 $\mu$ M de dNTPs (Gibco-BRL) e 2,5U de Taq-Polimerase (Biotools). Estes reagentes foram pipetados em fluxo laminar como no item 10.1, porém o produto amplificado da reação

de PCR foi pipetado em um terceiro ambiente evitando assim a contaminação das outras salas. Em todos os experimentos utilizou-se ponteiras com barreira, material autoclavado, luvas e jalecos específicos para cada um dos ambientes.

Foi testado nesta reação qual a concentração ideal de produto de PCR para ser utilizado no *nested*-PCR a fim de minimizar os produtos inespecíficos amplificados do próprio material genético das ostras. Os tubos foram colocados no termociclador e a etapa de desnaturação das fitas realizou-se a 94°C por 1min, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 57°C por 1min, e extensão a 72°C por 45seg. A extensão final ocorreu a 72°C por 5min.

## **11- DETERMINAÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR E *NESTED*-PCR PARA ADENOVÍRUS**

Este ensaio teve como objetivo determinar a sensibilidade das reações de PCR e *nested*-PCR para a detecção dos adenovírus presentes nas suspensões de Ad5 padrão e nos extratos de ostras experimentalmente inoculados.

### **11.1- Limite de sensibilidade das reações de PCR e *nested*-PCR realizados com as suspensões de Ad5 padrão.**

Neste ensaio, foram realizadas diluições seriadas na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ), das suspensões de Ad5 padrão, em meio de cultura MEM. As concentrações dos Ad5, nas respectivas diluições, estão mostradas na Tabela 3 .

O DNA viral das diluições foi extraído através do método de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico descrito no item 7.1 e realizou-se a reação de PCR e *nested*-PCR segundo descrito nos item 10.1 e 10.2, respectivamente.

**Tabela 3-** Diluições das suspensões de Ad5 padrão e suas respectivas concentrações.

| <b>Diluições da suspensão de Ad5 padrão</b> | <b>Concentração em PFU/ml</b> |
|---|-------------------------------|
| Puro  | $1,6 \times 10^6$             |
| $10^{-1}$                                   | $1,6 \times 10^5$             |
| $10^{-2}$                                   | $1,6 \times 10^4$             |
| $10^{-3}$                                   | $1,6 \times 10^3$             |
| $10^{-4}$                                   | $1,6 \times 10^2$             |
| $10^{-5}$                                   | 16                            |
| $10^{-6}$                                   | 1,6                           |
| $10^{-7}$                                   | $1,6 \times 10^{-1}$          |
| $10^{-8}$                                   | $1,6 \times 10^{-2}$          |
| $10^{-9}$                                   | $1,6 \times 10^{-3}$          |
| $10^{-10}$                                  | $1,6 \times 10^{-4}$          |
| $10^{-11}$                                  | $1,6 \times 10^{-5}$          |
| $10^{-12}$                                  | $1,6 \times 10^{-6}$          |

## 11.2- Limite de sensibilidade da PCR e nested-PCR para extratos de ostras experimentalmente inoculados.

Assim como para as suspensões de Ad5 padrão, também foram realizadas diluições seriadas na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ), dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas. As concentrações virais destes extratos de ostras em suas respectivas diluições, estão mostradas na Tabela 4. O DNA viral das diluições do extrato foi extraído através do método de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico descrito no item 7.2, e realizou-se as reações de PCR e *nested*-PCR, segundo descrito nos item 10.1 e 10.2, respectivamente.

**Tabela 4-** Diluições dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas e suas respectivas concentrações de adenovírus.

| Diluições  | Concentração em PFU/ml |
|------------|------------------------|
| Puro       | $1,2 \times 10^5$      |
| $10^{-1}$  | $1,2 \times 10^4$      |
| $10^{-2}$  | $1,2 \times 10^3$      |
| $10^{-3}$  | $1,2 \times 10^2$      |
| $10^{-4}$  | 12                     |
| $10^{-5}$  | 1,2                    |
| $10^{-6}$  | $1,2 \times 10^{-1}$   |
| $10^{-7}$  | $1,2 \times 10^{-2}$   |
| $10^{-8}$  | $1,2 \times 10^{-3}$   |
| $10^{-9}$  | $1,2 \times 10^{-4}$   |
| $10^{-10}$ | $1,2 \times 10^{-5}$   |
| $10^{-11}$ | $1,2 \times 10^{-6}$   |
| $10^{-12}$ | $1,2 \times 10^{-7}$   |

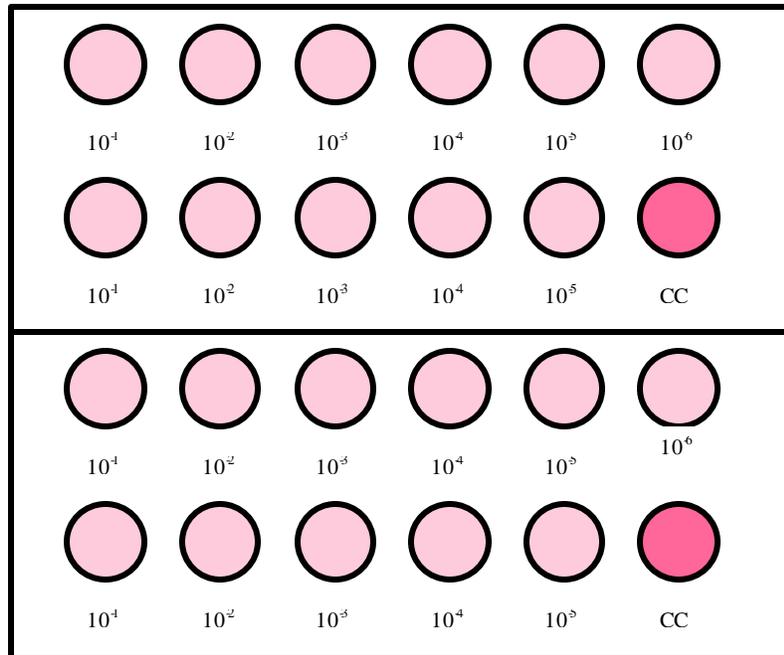
## 12- AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE OSTRAS

Este ensaio teve como objetivo estabelecer a diluição na qual o extrato de ostras preparado no item 6 não apresentava toxicidade para as células HEp-2. Esta diluição serviu como referência para o ensaio de PCR associado à cultura de células (ICC-PCR). Foram utilizados extratos de ostras não infectadas, com resultados confirmados por PCR e *nested*-PCR, a fim de que as alterações observadas nas células fossem exclusivamente devido ao efeito dos componentes teciduais das ostras.

Células HEp-2 (aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml), foram cultivadas em placas de 24 cavidades em meio MEM com adição de 5% de SBF e mantidas por 24h em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após este período, o extrato negativo (previamente tratado com antibióticos e antifúngico nas concentrações de 150µg/ml e 50µg/ml, respectivamente) foi diluído seriadamente na base de 10, de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>, em meio MEM. O meio de cultivo de cada uma das 24 cavidades contendo a monocamada de células foi retirado e foram inoculados 250µl das diferentes diluições do extrato negativo (quatro réplicas para cada diluição) (Figura 7) e as placas foram incubadas por 60 min a 37°C. Em seguida, o extrato foi retirado e as células suplementadas com 1ml de meio MEM acrescido de 1% de SBF. As placas foram incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24, 48, 72 e 96h. No final de cada período, a integridade das células foi observada no microscópio invertido, a fim de identificar possíveis alterações morfológicas celulares. Cada observação foi comparada com um controle celular (cc) (Figura 7), sem extrato de ostra, contendo apenas a monocamada celular e meio de

cultura. Após cada período, a integridade das células foi confirmada adicionando-se a cada cavidade 250µl do corante preto de naftaleno na concentração descrita no item 5.2.



**Figura 7-** Esquema da placa utilizada para a determinação da citotoxicidade das diferentes diluições dos extratos de ostras. As cavidades contendo monocamadas de células HEP-2, foram incubadas com as diluições indicadas de extratos de ostras não infectadas.

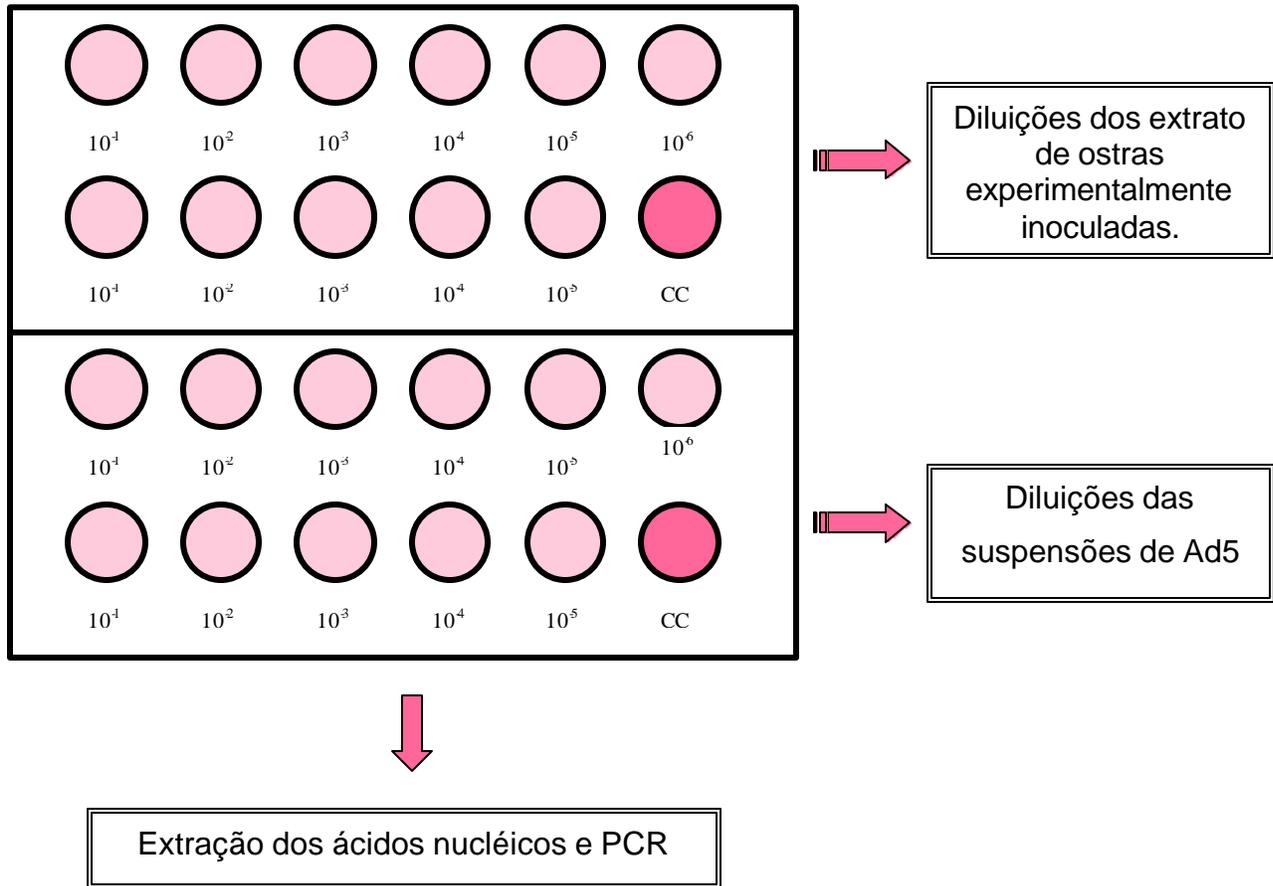
### **13- DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS ATRAVÉS DO ENSAIO DE PCR INTEGRADO A CULTURA CELULAR (ICC-PCR)**

Este ensaio foi realizado em triplicata onde foram utilizados extratos de ostras experimentalmente inoculadas com Ad5 padrão na concentração de  $1,2 \times 10^5$  PFU/ml de extrato e suspensões de Ad5 padrão na concentração de  $1,6 \times 10^6$  PFU/ml, que foram diluídos seriadamente na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) em meio MEM.

Células HEp-2 foram cultivadas em placas de 24 cavidades até atingirem confluência. Após este período, 250 $\mu$ l de cada uma das diluições foram adicionadas em duplicata nas células por 60min a 37°C. Ao final deste período, o inóculo foi retirado e as células foram adicionadas de 1ml de meio MEM suplementado com 1% de SBF e 1% da solução de antibióticos e antifúngico. As placas foram incubadas a 37°C por até 96h. A cada 24h, as placas foram retiradas da estufa e submetidos a três ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento, para que houvesse o rompimento das membranas celulares a fim de liberar no sobrenadante as partículas virais infectantes.

Após este processo, o meio foi retirado das cavidades e colocado em microtubos devidamente identificados com as diluições e os tempos correspondentes. O próximo passo foi realizar a extração dos ácidos nucléicos (segundo o item 7.1) de cada uma dessas diluições para posterior detecção por PCR (segundo o item 10.1) dos AdV presentes nas suspensões de Ad5 padrão e extratos de ostras experimentalmente inoculadas (Figura 8).

Este ensaio teve como objetivo determinar se com a incubação dos extratos de ostras e das suspensões de Ad5 padrão nas células HEp-2, o limite de sensibilidade da reação de PCR era aumentado. Assim, seria possível selecionar o melhor tempo e diluição necessária para determinar a presença viral nos extratos de ostras das amostras ambientais.



**Figura 8-** Esquema da placa utilizada no ensaio de ICC-PCR. Monocamadas de células HEp-2 foram incubadas com as diluições indicadas de extrato de ostras experimentalmente inoculadas e com diluições do adenovírus padrão.

## **14- DETECÇÃO DOS ADENOVÍRUS PRESENTES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Após a padronização dos ensaios, as 20 amostras ambientais coletadas durante os meses de abril a outubro de 2002 (item 1.2.1), foram processadas segundo item 6 e os extratos foram analisados por PCR, *nested*-PCR (itens 10.1 e 10.2) e ICC-PCR (item 13).

No ensaio de ICC-PCR, todas as 20 amostras foram incubadas na diluição  $10^{-2}$  (diluição não citotóxica), em duplicata, em células HEp-2, cultivadas em placas de 24 cavidades que foram incubadas a 37°C por 72h. Após este processo, as placas foram congeladas e descongeladas por 3X, os ácidos nucléicos foram extraídos e realizou-se a reação de PCR.

## **15- VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR E *NESTED*-PCR**

A análise dos produtos de PCR e *nested*-PCR foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e em gel de agarose a 1,5% em TBE (Tris/Borato/EDTA) (SAMBROOK et al., 2001), que foram visualizados após a coloração dos géis com brometo de etídeo na concentração de 1µg/ml e posteriormente expostos à luz UV em transiluminador e fotografados com aparelho digital Kodak Image System.

**RESULTADOS**

---

## **1- CULTIVO DAS CÉLULAS HEp-2**

A metodologia descrita para o cultivo de células, permitiu o crescimento, a propagação e a formação das monocamadas celulares em até 24h em garrafas de 75cm<sup>2</sup> e em placas de 24 e 96 cavidades, quando cultivadas em meio MEM suplementado com 5% de SBF.

## **2- OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ADENOVÍRUS PADRÃO**

As células HEp-2 se mostraram permissivas à infecção pelo Ad5, apresentando efeito citopático (ECP) caracterizado por arredondamento, aumento de volume citoplasmático e, às vezes se agrupando em “cachos” (LENNETE, 1979). Estas observações morfológicas foram observadas a partir de 24h de infecção e continuavam evoluindo até por volta de 72h, quando o efeito citopático atingia cerca de 90% das células.

## **3- TÍTULO INFECCIOSO DO AD5 PADRÃO**

O título infeccioso do Ad5 padrão foi determinado através de dois métodos:

### **3.1- MÉTODO DAS DILUIÇÕES-LIMITE**

Utilizando o método de cálculo de Reed-Muench, foi determinado o título de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml de adenovírus na suspensão de Ad5, utilizada como controle positivo em todos os ensaios subseqüentes.

### **3.2- Método de contagem de placas de lise**

Utilizando o método de formação de placas de lise, foi determinado o título de  $1,6 \times 10^6$  PFU/ml na suspensão de Ad5 padrão, este valor foi escolhido como referência durante este trabalho por ser mais representativo, uma vez que os valores em  $TCID_{50}$  indicam apenas a capacidade dos vírus de infectar 50% das células hospedeiras.

Nas duas metodologias foram necessários pelo menos 72h para determinar o título infeccioso viral.

## **4- QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL DOS NLVS**

O RNA viral dos NLVs, obtido a partir das suspensões de fezes a 5% foi dosado espectrofotometricamente de acordo com o item 8, a concentração foi de  $191 \mu\text{g/ml}$ , apresentando um valor de 1,7 para a relação entre absorbâncias 260/280nm.

## **5- ENSAIO DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DO RNA DOS NLVS**

### **5.1- Transcrição reversa**

Foram avaliados dois protocolos de transcrição reversa, utilizando diferentes concentrações de  $\text{MgCl}_2$ . Estes protocolos foram testados utilizando RNA de NLVs extraído das suspensões de fezes e extratos de ostras experimentalmente inoculadas. Quando estes protocolos foram testados utilizando RNA extraído das suspensões de fezes, foi possível, após a realização da RT-PCR, amplificar a seqüência esperada com

o protocolo 1 (3mM de  $MgCl_2$ ) de transcrição reversa, o que não aconteceu aplicando o protocolo 2 (4,5mM de  $MgCl_2$ ) (Figura 9, linhas 2 e 3, respectivamente).

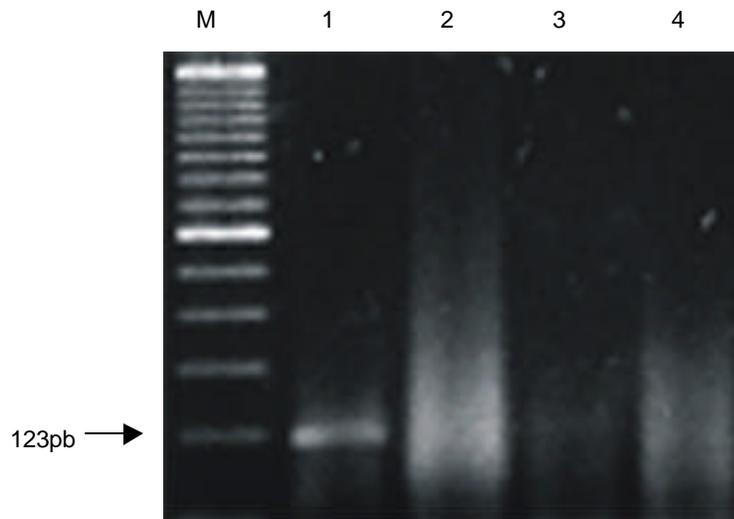
Após a determinação do protocolo mais eficiente de transcrição reversa (protocolo 1), este foi aplicado utilizando RNA extraído de extratos de ostras experimentalmente inoculados com suspensões de fezes, porém não houve sucesso nas reações de amplificação gênica, mesmo após sucessivas repetições deste ensaio (Figura 9, linha 5).

## **5.2- Determinação da concentração ideal dos componentes do tampão e pH para a reação de PCR para os NLVs**

Este ensaio permitiu testar simultaneamente três variáveis importantes na reação de PCR: o pH e as concentrações ideais de  $MgCl_2$  e de KCl.

A Figura 10 mostra a amplificação do RNA viral extraído das suspensões de fezes, que ocorreu somente quando utilizou-se três dos doze tampões do kit.

A partir deste resultado, o tampão n° 3 (Tris-HCl pH 8,3,  $MgCl_2$  3,5mM, KCl 25mM ) foi sempre utilizado.



**Figura 9-** RT-PCR para a detecção de NLVs. Gel de agarose a 1,7% apresentando os produtos de reação com suspensões de fezes e extratos de ostras inoculadas.

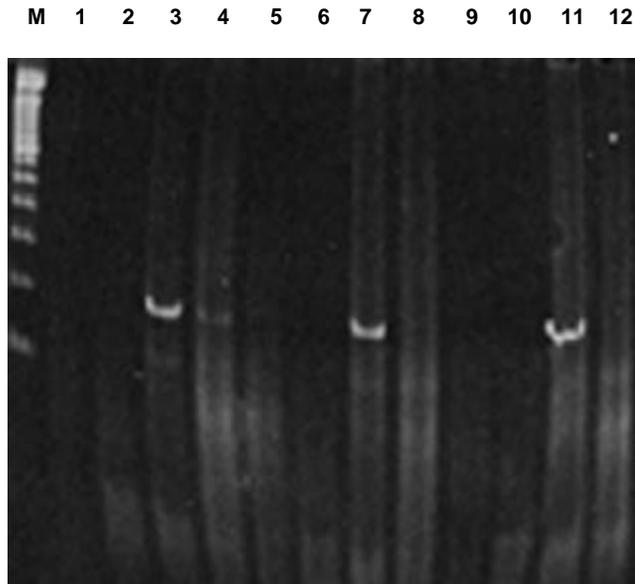
M- 100pb ladder,

1- Transcrição reversa a partir de suspensões de fezes utilizando o protocolo 1 (3,0mM de  $MgCl_2$ ).

2- Transcrição reversa a partir de suspensões de fezes utilizando o protocolo 2 (4,5mM de  $MgCl_2$ ).

3- Controle negativo.

4- Transcrição reversa a partir dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas utilizando o protocolo 1.



**Figura 10-** Gel de poliacrilamida a 10% apresentando o teste das condições salinas e pH. M- 100pb ladder; 3- Tris-Hcl pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 3,5mM, KCl 25mM (tampão 3); 7- Tris-Hcl pH 8,8, MgCl<sub>2</sub> 3,5mM, KCl 25mM (tampão 7); 11- Tris-Hcl pH 9,2, MgCl<sub>2</sub> 3,5mM, KCl 25mM (tampão 11).

## **6- ENSAIOS DE PCR E *NESTED*-PCR PARA A DETECÇÃO DE DNA DOS ADV**

Estes ensaios foram realizados com DNAs de AdV extraídos a partir das suspensões de Ad5 padrão e dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas.

### **6.1- Padronização da concentração ideal de DNA para o nested-PCR**

Visando diminuir a quantidade de bandas inespecíficas na reação de *nested*-PCR a partir de extrato de ostras experimentalmente inoculadas, foram testadas concentrações de DNA amplificado (5 $\mu$ l, 3 $\mu$ l e 1 $\mu$ l) tanto para as suspensões de Ad5 padrão, quanto para o extrato de ostras experimentalmente inoculadas (Figura 11). Após a reação de PCR, verificou-se que utilizando 1 $\mu$ l de DNA amplificado a partir de extratos de ostras experimentalmente inoculadas, houve uma diminuição nas bandas inespecíficas (linha 7). Em relação às suspensões de Ad5 padrão, não se observou diferença entre as concentrações de DNA viral testadas.

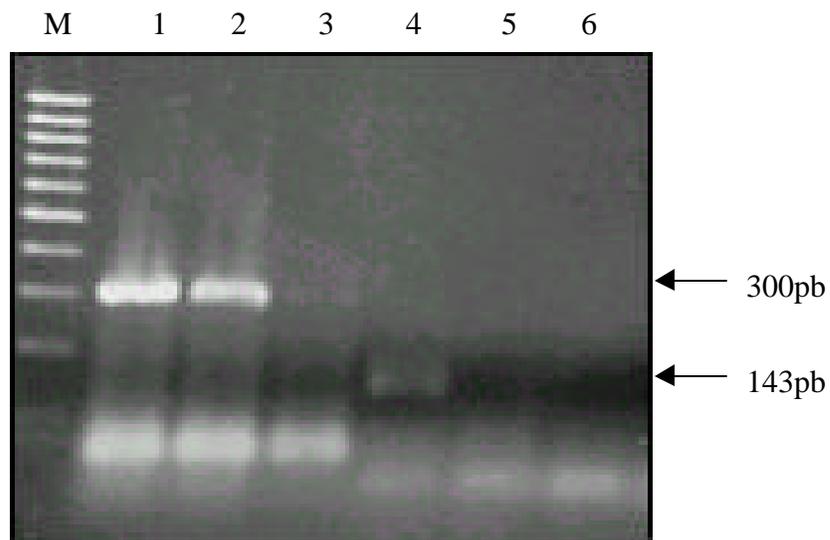
### **6.2- Reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*- PCR para o DNA viral obtido a partir das suspensões de Ad5 padrão**

#### **6.2.1- Limite mínimo de detecção do DNA viral**

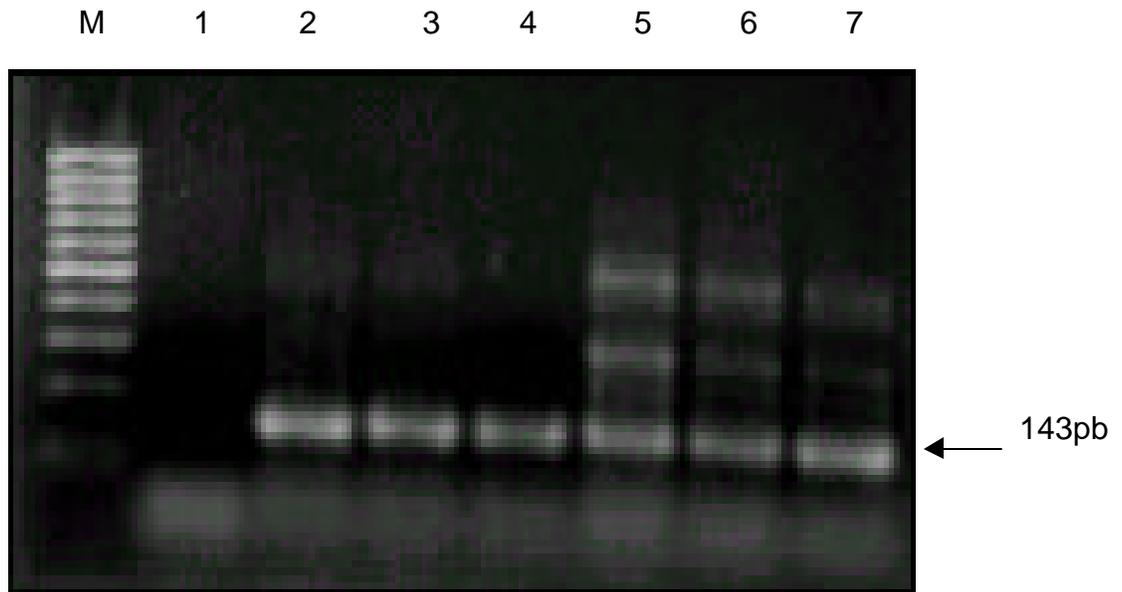
O limite de sensibilidade para detecção da região do *hexon* do genoma dos ADVs, foi obtido a partir das suspensões de Ad5 padrão, foi determinado utilizando a PCR e o *nested*-PCR.

Na Figura 12, pode-se observar que utilizando-se apenas a reação de PCR, o limite mínimo de detecção viral foi de 16 PFU/ml (linha 2) enquanto que quando houve

um passo a mais de amplificação gênica (*nested-PCR*), o limite mínimo de detecção foi de 0,00016 PFU/ml (linha 5).



**Figura 11-** Gel de agarose a 1,7% apresentando o limite de sensibilidade das suspensões de Ad5 padrão. 1-3 PCR, 4-5 *nested-PCR*, valores em PFU/ml. M- Marcador 1-  $1,6 \times 10^2$ ; 2- 16; 3- 1,6; 4-  $1,6 \times 10^{-4}$ ; 5-  $1,6 \times 10^{-5}$ ; 6- Controle negativo.

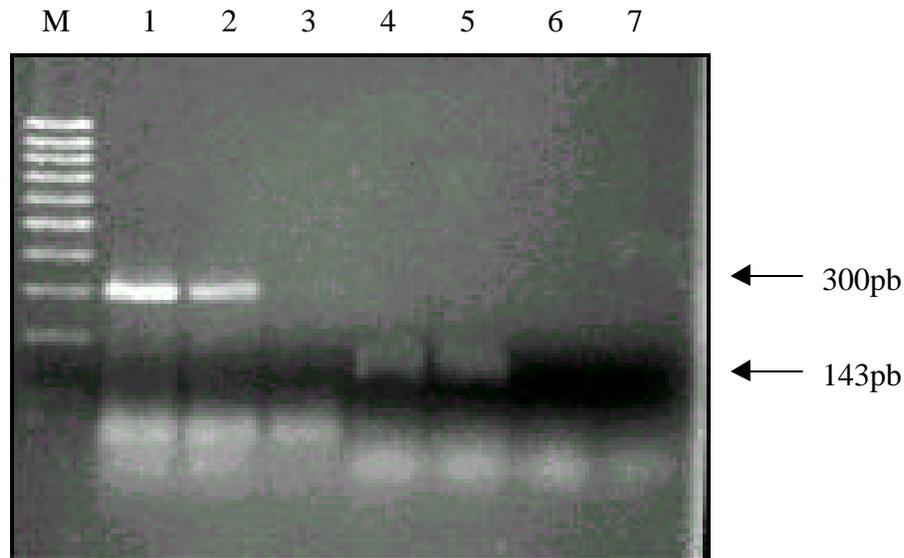


**Figura 12-** Gel de agarose a 1,7% apresentando os produtos das reações de *nested*-PCR utilizando diferentes concentrações de produto de PCR de suspensões de Ad5 padrão e extratos de ostras experimentalmente inoculadas. M- marcador 100pb; 1- Controle negativo; 2,3,4- 5, 3 e 1 $\mu$ l (suspensões de Ad5 padrão); 5,6,7- 5, 3 e 1  $\mu$ l (extratos de ostras experimentalmente inoculados).

### 6.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*- PCR para o DNA viral obtido a partir dos extratos de ostras experimentalmente inoculados com suspensões de Ad5 padrão

#### 6.3.1- Limite mínimo de detecção do DNA viral

O limite de sensibilidade da amplificação da região do hexon do genoma dos AdVs obtido a partir dos extratos de ostras experimentalmente inoculados com suspensões de Ad5 padrão, foi determinado utilizando a PCR e *nested*-PCR. No ensaio de PCR o limite mínimo de detecção foi de  $1,2 \times 10^2$  PFU/g de ostra, enquanto que utilizando o *nested*-PCR, o limite foi de 1,2 PFU/g de ostra (Figura 13).



**Figura 13:** Gel de agarose a 1,7% apresentando o limite de sensibilidade do extrato de ostras experimentalmente inoculadas. Linhas 1, 2 e 3, resultados do PCR, linhas 4, 5 e 6 resultados do *nested*-PCR, valores em PFU/ml. **M**- Marcador; **1**-  $1,2 \times 10^3$ ; **2**-  $1,2 \times 10^2$ ; **3**- 12; **4**- 12; **5**- 1,2; **6**- 0,12; **7**- Controle negativo.

## 7- AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE OSTRAS

A avaliação da citotoxicidade dos extratos de ostras foi realizada em células HEp-2, mediante a observação qualitativa, no microscópio invertido, das alterações morfológicas celulares e da integridade do tapete celular em diferentes períodos de incubação (24, 48, 72 e 96h) através da coloração das células pelo corante preto de naftaleno. De acordo com as observações, foi possível determinar que os extratos de ostras a partir da diluição  $10^{-2}$ , não foram citotóxicos até 96h (Tabela 6). A diluição  $10^{-1}$  se mostrou citotóxica em 24h aumentando gradativamente com o tempo até ocorrer destruição das células em 96h.

**Tabela 6-** Avaliação qualitativa da toxicidade de diferentes diluições do extrato de ostras, em 24, 48, 72 e 96h, em células HEp-2.

| Citotoxicidade |     |     |     |     |
|----------------|-----|-----|-----|-----|
| Diluições      | 24h | 48h | 72h | 96h |
| $10^{-1}$      | ++  | ++  | +++ | +++ |
| $10^{-2}$      | -   | -   | -   | -   |
| $10^{-3}$      | -   | -   | -   | -   |
| $10^{-4}$      | -   | -   | -   | -   |
| $10^{-5}$      | -   | -   | -   | -   |
| $10^{-6}$      | -   | -   | -   | -   |

(+++): Destruição total da monocamada celular.

(++/+): Destruição parcial da monocamada celular.

( - ): Monocamada celular conservada.

## **8- DETECÇÃO DOS ADENOVÍRUS ATRAVÉS DO ENSAIO DE PCR ASSOCIADO À CULTURA CELULAR (ICC-PCR)**

Durante a padronização deste ensaio, foram utilizadas diluições seriadas das suspensões de Ad5 padrão e dosextatos de ostras experimentalmente inoculadas em células HEp-2 em diferentes tempos, a fim de verificar o limite de sensibilidade através da reação de PCR associada à cultura de células.

### **8.1 Ensaio de ICC-PCR para detecção de adenovírus em suspensões de Ad5 padrão**

Neste ensaio, no tempo de 24h, foi possível detectar a presença de adenovírus até a concentração de  $1,6 \times 10^3$  PFU/ml. À medida que o período de incubação foi aumentado, o limite de sensibilidade também foi, havendo assim uma relação direta entre eles. Observou-se que, a partir de 48 até 96h de incubação, o limite de sensibilidade foi de até 1,6 PFU/ml (Tabela 7).

**Tabela 7-** Limites de sensibilidade de detecção em diferentes diluições das suspensões de Ad5 padrão em 24, 48, 72 e 96h através do ensaio de ICC-PCR.

| Diluições/Tempo | Concentração em PFU/ml |                   |                   |                   |
|-----------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                 | 24h                    | 48h               | 72h               | 96h               |
| $10^{-1}$       | $1,6 \times 10^5$      | $1,6 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^5$ |
| $10^{-2}$       | $1,6 \times 10^4$      | $1,6 \times 10^4$ | $1,6 \times 10^4$ | $1,6 \times 10^4$ |
| $10^{-3}$       | $1,6 \times 10^3$      | $1,6 \times 10^3$ | $1,6 \times 10^3$ | $1,6 \times 10^3$ |
| $10^{-4}$       | -                      | $1,6 \times 10^2$ | $1,6 \times 10^2$ | $1,6 \times 10^2$ |
| $10^{-5}$       | -                      | 16                | 16                | 16                |
| $10^{-6}$       | -                      | 1,6               | 1,6               | 1,6               |

( - ) Não detectado.

## 8.2 Ensaio de ICC-PCR para detecção de adenovírus em extratos de ostras experimentalmente inoculadas

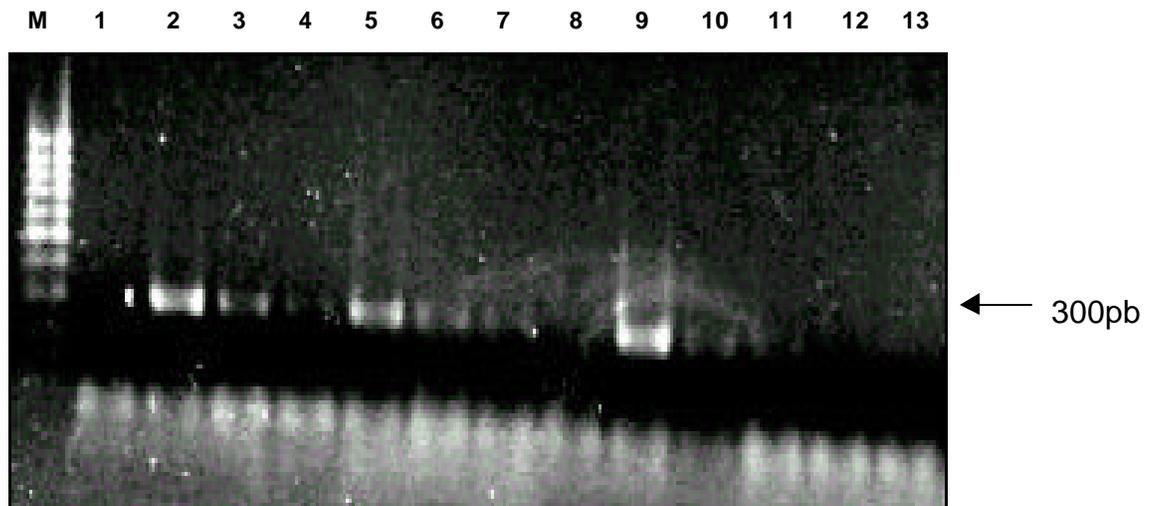
O ensaio de ICC-PCR com os extratos de ostras demonstrou que o período de 24h de incubação não foi suficiente para detectar os adenovírus presentes nos extratos, provavelmente, pela baixa concentração destes. A partir de 48h de incubação, houve um aumento na sensibilidade, passando de  $1,2 \times 10^3$  PFU/ml em 48h para  $1,2 \times 10^2$  PFU/ml, nos tempos de 72 e 96h (Tabela 8 e Figura 14).

A associação das duas técnicas não demonstrou maior eficiência, já que o limite de sensibilidade atingido foi igual ao da reação de PCR.

**Tabela 8-** Limites de sensibilidade de detecção em diferentes diluições de extratos de ostras experimentalmente inoculadas, em 24, 48, 72 e 96h, através do ensaio de ICC-PCR

| Diluições/tempo | Concentração em PFU/ml |                   |                   |                   |
|-----------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                 | 24h                    | 48h               | 72h               | 96h               |
| $10^{-1}$       | -                      | $1,2 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^4$ |
| $10^{-2}$       | -                      | $1,2 \times 10^3$ | $1,2 \times 10^3$ | $1,2 \times 10^3$ |
| $10^{-3}$       | -                      | -                 | $1,2 \times 10^2$ | $1,2 \times 10^2$ |
| $10^{-4}$       | -                      | -                 | -                 | -                 |
| $10^{-5}$       | -                      | -                 | -                 | -                 |
| $10^{-6}$       | -                      | -                 | -                 | -                 |

( - ) Não detectado.



**Figura 14-** Detecção de adenovírus através do ensaio de ICC-PCR, nos tempos de 24, 48, 72 e 96h em extratos de ostras experimentalmente inoculadas. M- marcador; 1- 24h; 2,3,4-  $1,2 \times 10^4$ ,  $1,2 \times 10^3$ ,  $1,2 \times 10^2$  (48h); 5,6,7,8-  $1,2 \times 10^4$ ,  $1,2 \times 10^3$ ,  $1,2 \times 10^2$ , 12 (72h); 9,10,11,12-  $1,2 \times 10^4$ ,  $1,2 \times 10^3$ ,  $1,2 \times 10^2$ , 12 (96h); 13- controle negativo.

## 9- DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS PRESENTES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Após a padronização das metodologias de PCR, *nested*-PCR e ICC-PCR utilizando suspensões de Ad5 padrão e extratos de ostras experimentalmente inoculadas, estas foram realizadas para a verificação da presença de adenovírus nas amostras ambientais coletadas durante os meses de abril a outubro de 2002, em três pontos de cultivo no norte da ilha de Florianópolis.

Não foi verificada positividade em nenhuma das 20 amostras submetidas à reação de PCR (Tabela 9), com exceção dos controles positivos (extratos de ostras experimentalmente inoculadas). Porém quando estas amostras foram analisadas através da reação de *nested*-PCR, foi encontrada positividade em 18 (90%) amostras. As amostras negativas foram as dos meses de abril e maio, nos sítios 2 e 3, respectivamente (Figura 15).

As 20 mostras ambientais também foram submetidas ao ensaio de ICC-PCR, onde foram diluídas ( $10^{-2}$ ) e inoculadas em células HEp-2 por 72h a fim de verificar se as amostras que foram negativas através do *nested*-PCR eram confirmadas por este ensaio. Devido a problemas na cultura de células, este ensaio não pode ser finalizado a tempo do término deste trabalho.

## 10- ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras de água foram coletadas nos três sítios de cultivo durante os sete meses e processadas segundo o item 1.2.1(Métodos), obtendo resultados indicativos descritos na Tabela 9.

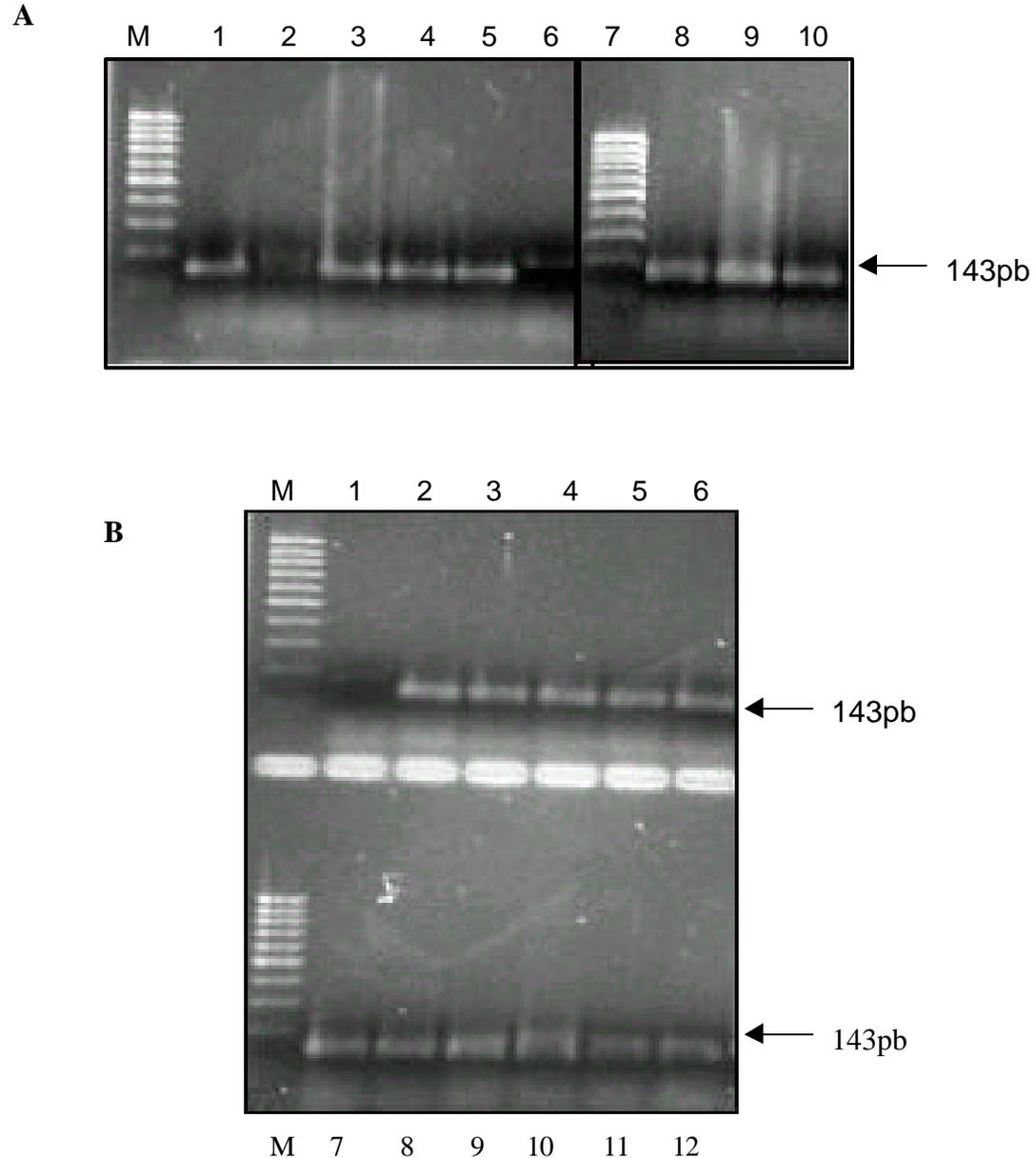
Em, pelo menos, quatro meses (80%) as amostras tiveram uma média de 14 NMP/100mL com nenhuma amostra (10% = 0,5) excedendo 43 NMP/100mL.

Os sítios 1 e 2 apresentaram três meses de contaminação e o sítio 3 somente um, no entanto neste sítio não houve coleta no período em que houve contaminação nos outros locais.

**Tabela 9-** Resultados das análises das amostras de ostras e de água coletadas nos meses de abril a outubro de 2002, nos três locais de cultivo, em Florianópolis.

|                | PCR | <i>Nested</i> -PCR | Coliformes fecais MPN/100ml |
|----------------|-----|--------------------|-----------------------------|
| <b>Sítio 1</b> |     |                    |                             |
| Abril          | -   | +                  | NP                          |
| Maio           | -   | +                  | NP                          |
| Junho          | -   | +                  | 23                          |
| Julho          | -   | +                  | 350                         |
| Agosto         | -   | +                  | 13                          |
| Setembro       | -   | +                  | 46                          |
| Outubro        | -   | +                  | 5                           |
| <b>Sítio 2</b> |     |                    |                             |
| Abril          | -   | -                  | NP                          |
| Maio           | -   | +                  | NP                          |
| Junho          | -   | +                  | 5                           |
| Julho          | -   | +                  | 350                         |
| Agosto         | -   | +                  | 23                          |
| Setembro       | -   | +                  | 33                          |
| Outubro        | -   | +                  | < 2                         |
| <b>Sítio 3</b> |     |                    |                             |
| Abril          | -   | +                  | NP                          |
| Maio           | -   | -                  | NP                          |
| Junho          | -   | +                  | 8                           |
| Julho          | NP  | NP                 | NP                          |
| Agosto         | -   | +                  | < 2                         |
| Setembro       | -   | +                  | 33                          |
| Outubro        | -   | +                  | 5                           |

NP- amostras não processadas



**Figura 15-** Resultados obtidos através da reação de *nested*-PCR para as amostras ambientais nos três sítios (1, 2 e 3). **A:** M- marcador; 1- sítio 1 (abril); 2- sítio 2 (abril); 3- sítio 3 (abril); 4- sítio 1 (maio); 5- sítio 2 (maio); 6- sítio 3 (maio); 7- sítio 1 (junho); 8- sítio 2 (junho); 9- sítio 3 (junho); **B:** M- marcador; 1- controle negativo; 2- sítio 1 (julho); 3- sítio 2 (julho); 4- sítio 1 (agosto); 5- sítio 2 (agosto); 6- sítio 3 (agosto); 7- sítio 1 (setembro); 8- sítio 2 (setembro); 9- sítio 3 (setembro); 10- sítio 1 (outubro); 11- sítio 2 (outubro); 12- sítio 3 (outubro).

***DISCUSSÃO***

---

Com o crescente desenvolvimento da maricultura no Estado de Santa Catarina, em 1998, surgiu a oportunidade do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, juntamente com o governo canadense através do BMLP, desenvolver metodologias que assegurassem a qualidade sanitária destes moluscos através da detecção de patógenos humanos em ostras.

Os resultados obtidos até o momento demonstraram que é possível detectar rotavírus, vírus da hepatite A e poliovírus tanto em ostras inoculadas no laboratório (COELHO, 2003; SANTOS et al., 2001; 2002; VINATEA, 2002), como em ostras contaminadas no ambiente onde as mesmas são cultivadas (COELHO, 2003).

O crescente aumento da descarga de poluentes químicos, orgânicos e dejetos fecais em rios, córregos e mares tem comprometido cada vez mais a qualidade das águas de consumo, recreação e cultivo de moluscos. Os atuais parâmetros que refletem a qualidade dessas águas são baseados no monitoramento de coliformes totais e fecais nas águas de cultivo e de consumo humano (PINA et al., 1998). Contudo tais parâmetros não asseguram a qualidade destas águas, uma vez que a presença de vírus humanos e outros patógenos epidemiologicamente importantes não é considerada (HERNROTH et al., 2002; BEURET et al., 2003).

O presente trabalho visou estabelecer uma metodologia sensível e eficiente para detecção dos vírus NLV e adenovírus naturalmente presentes em ostras de cultivo.

A escolha destes agentes virais foi baseada, no risco que estes apresentam à saúde pública quando presentes no meio ambiente.

Os vírus NLV estão distribuídos mundialmente e possuem uma importante relação com surtos de gastroenterite associados ao consumo de moluscos (GREEN & LEWIS, 1999; LEES, 2000; LE GUYADER, 2000; BEURET, 2003).

Com relação aos adenovírus, muitos pesquisadores têm sugerido a sua utilização como um indicador biológico da presença de contaminação viral humana no meio ambiente, principalmente pela sua ampla distribuição, quantidade de sorotipos circulantes aliado à grande estabilidade e resistência a condições adversas e também pelo fato destes vírus serem normalmente detectados também quando há a presença de outros enterovírus (PINA et al., 1998; CHO et al., 2000; LEES, 2000; MUNIAIN-MUJICA et al., 2000; HERNROTH et al., 2002; GIRONES, 2002).

Optou-se por utilizar o genogrupo 2 (G2) dos NLVs, como controle positivo neste trabalho, uma vez que as amostras obtidas no Instituto Adolpho Lutz-SP, eram positivas para este genogrupo. Dados recentes indicam que o genogrupo G2 tem tido a maior prevalência no mundo, sendo reconhecido como a principal causa de surtos epidêmicos de gastroenterites ocorrendo em todas as idades, incluindo crianças (mais velhas) e adultos (LEES, 2000; SCHWAB, 2000).

O adenovírus tipo 5 (Ad5) foi selecionado como vírus padrão para este trabalho, com base na sua facilidade de multiplicar-se numa linhagem celular estabelecida, células HEp-2, o que facilitou sua obtenção. A suspensão de adenovírus padrão foi obtida mediante inoculação nessas células, que apresentam alterações morfológicas após a inoculação viral, evidenciando a sua alta susceptibilidade, uma vez que arredondamento celular, aumento do volume citoplasmático e o agrupamento das células em cachos são característicos da infecção por adenovírus (FIELDS et al., 1996).

Tendo por base o aparecimento de efeito citopático (ECP), foi determinado o título da suspensão viral de adenovírus pelos métodos de diluições limite (Reed-Muench) e contagem de placas de lise. Os valores obtidos por ambas as metodologias foram semelhantes com a diferença de 1 log ( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> e  $1,6 \times 10^6$  PFU/ml). Optou-se por utilizar os valores obtidos em PFU, uma vez que a precisão da técnica de Reed-Muench por ser de interpretação subjetiva é inferior à de métodos que permitem contabilizar o número de unidades formadoras de focos de infecção ou placas de lise (BURLINSON et al., 1992).

O desenvolvimento de protocolos eficientes para extração de vírus entéricos a partir de tecidos de moluscos e a posterior concentração dos mesmos em um volume pequeno de amostra são etapas importantes na padronização das metodologias de detecção viral, sejam elas moleculares, como a reação de PCR, ou convencionais, como a cultura de vírus em células (LEES, 2000). Estes protocolos são divididos em duas categorias: extração-concentração e adsorção-eluição-concentração (BOUHRITI & GOYAL 1993; LEES, 2000).

Nos métodos de extração-concentração, normalmente, a extração viral é realizada diretamente a partir dos tecidos do molusco com éter etílico, clorofórmio ou Freon e os procedimentos de concentração constam de precipitação ácida, floculação polieletrólítica com Cat-Floc<sup>®</sup> (GERBA, 1987; BOUHRITI & GOYAL 1993; LEES, 2000).

No presente trabalho, as ostras inoculadas com as suspensões de adenovírus padrão Ad5 e com fezes positivas para Norwalk-like foram processadas pelo método de

adsorção-eluição-precipitação, visando extrair as partículas virais dos tecidos dos moluscos e concentrar as amostras em volumes menores.

A eluição alcalina foi utilizada por Lees et al. (1994) e Lewis & Metcalf (1988). Sobsey, Carrick, Jensen (1978) observaram que os vírus podem ser separados dos sólidos presentes nos extratos tissulares dos moluscos quando concentrações de sais e o pH são controlados. Diferentes eluentes contendo glicina, extrato de carne ou outros componentes têm sido comparados com a finalidade de determinar quais oferecem o melhor índice de recuperação viral (LEWIS & METCALF, 1998, LEES, 2000).

A utilização do meio triptose-fosfato (TPB), em presença do tampão glicina, pH 9, para eluição viral, foi adotado por ser um eluente capaz de propiciar um bom índice de recuperação de partículas virais, como observado por Lewis & Metcalf (1998), Barardi et al. (1999), Shieh et al. (1999), Santos et al. (2001; 2002), Vinatea (2002); Coelho et al. (2003).

Após a eluição, a precipitação ácida pode ser realizada, na qual os vírus precipitam junto com a matéria orgânica presente nos extratos (METCALF et al., 1980), utilizando polietilenoglicol (PEG), floculação orgânica ou ultracentrifugação (BOUCHRITI & GOYAL 1993).

No presente trabalho, a precipitação das partículas virais foi realizada utilizando-se PEG, que é um polímero sintético, quimicamente inerte, não-tóxico, solúvel em água e amplamente utilizado na precipitação de proteínas (LEWIS & METCALF, 1998).

O desenvolvimento da técnica de PCR, que permite a detecção de seqüências gênicas de microrganismos pela sua amplificação, aprimorou a possibilidade de avaliação da presença de vírus entéricos no meio ambiente. Entretanto, um dos

principais problemas enfrentados por esta técnica é a frequência com que as amostras ambientais apresentam substâncias inibidoras, capazes de interferir no sistema enzimático utilizado na reação, inibindo o processo de amplificação (ARNAL, 1999; LEES, 2000).

Visando remover os inibidores das reações de PCR a partir dos concentrados, inúmeras técnicas de complexidade variável estão disponíveis para a extração dos ácidos nucléicos, desde a simples fervura da amostra, até métodos mais elaborados envolvendo lise celular em tampão salino na presença de detergentes e enzimas proteolíticas, seguidas por extração orgânica, todas elas com o intuito de eliminar inibidores das amostras (ARNAL et al., 1999).

Outras tentativas com este mesmo objetivo foram realizadas nos trabalhos desenvolvidos por Atmar et al. (1995), Schwab et al. (1998), que trabalharam na determinação da concentração de inibidores, encontrados em diferentes partes dissecadas de ostras inoculadas experimentalmente ou contaminadas no ambiente com vírus entéricos. SCHWAB et al. (1998) encontraram maior concentração de inibidores no músculo adutor, seguido do trato gastrointestinal e hemolinfa. Segundo Le Guyader et al. (2000), Schwab et al. (2001), resultados melhores e mais representativos foram obtidos mediante análise do tecido digestivo ou hepatopâncreas, quando comparada à análise dos moluscos com um todo, sem dissecação.

No presente trabalho, duas metodologias para extração de ácidos nucléicos foram utilizadas dependendo do tipo viral que foi trabalhado: a metodologia clássica, utilizando fenol-clorofórmio na extração do DNA viral a partir das suspensões de adenovírus padrão e dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas, e a metodologia utilizando o reagente TRIZOL<sup>®</sup>, uma mistura comercial de fenol e

isotiocianato de guanidina na extração do RNA de NLVs a partir das suspensões de fezes e dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas.

As amostras de extratos de ostras experimentalmente inoculadas com AdVs ou NLVs, sofreram um tratamento prévio antes da extração orgânica, visando diminuir a concentração de inibidores. Foi realizada a digestão com a enzima proteinase K, a fim de degradar as proteínas da amostra, e a purificação com cetiltrimetilamônio (CTAB), que é um detergente catiônico utilizado na precipitação seletiva dos ácidos nucléicos e eliminação de polissacarídeos das amostras (STRAUB et al., 1994; ARNAL et al., 1999; SHIEH et al., 1999; LEES, 2000).

O RNA viral obtido a partir das suspensões de fezes foi quantificado espectrofotometricamente através da leitura da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 e 280nm, simultaneamente. A concentração do RNA foi de 191µg/ml. A taxa de pureza da amostra foi medida através da razão entre as absorvâncias a 260nm e 280nm, onde são medidas as impurezas protéicas. A razão encontrada foi de 1,7 indicando um grau de pureza considerável do material genético obtido (SAMBROOK et al., 2001).

## **1- ENSAIO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DE NLVs EM SUSPENSÕES DE FEZES E OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS**

O ensaio de RT-PCR para o vírus NLV visou a amplificação da região da RNA polimerase das diferentes cepas destes vírus a partir das suspensões de fezes e de extratos de ostras experimentalmente inoculadas, utilizando os iniciadores definidos por

Ando et al. (1995). Foram avaliados dois protocolos de transcrição reversa utilizando RNA de NLVs e diferentes concentrações de  $MgCl_2$  (Item 9.1). É importante ressaltar a influência da concentração dos íons  $Mg^{+2}$  em diversas etapas da reação de PCR, tais como anelamento dos iniciadores, especificidade do produto, temperatura de dissociação das fitas, formação de dímeros de iniciadores e atividade e fidelidade das enzimas que requerem cátions divalentes. Altas concentrações desse íon podem promover amplificações inespecíficas, resultando numa baixa especificidade de reação, enquanto que pequenas concentrações podem resultar em pouca eficiência de amplificação (SAMBROOK et al., 2001).

Na figura 9, observou-se que o protocolo 1, com concentração de 3mM de  $MgCl_2$ , apresentou maior eficiência na amplificação gênica. Este resultado foi contrário ao obtido por ANDO et al. (1995), que encontraram que a concentração de 4,5mM deste reagente seria a ideal na reação de transcrição reversa.

Uma vez definida a concentração ideal de  $MgCl_2$  na reação de transcrição reversa, foi determinada a concentração salina ideal da reação de PCR utilizando o kit com diferentes valores de pH, concentrações finais de  $MgCl_2$  e de KCl.

Foi constatado que houve amplificação do NLV com bandas intensas após coloração com brometo de etídeo, somente quando se utilizou 3 dos 12 tampões do kit (Figura 10, linhas 4, 8, 12). Após a definição das concentrações ideais na transcrição reversa e na PCR, estes protocolos foram testados para RNAs de NLVs extraídos de extratos de ostras experimentalmente inoculadas. Porém, observou-se que não houve amplificação gênica, possivelmente, devido à interferência de inibidores presentes nos tecidos dos moluscos e à susceptibilidade da fita única de RNA destes vírus de degradar facilmente em presença dos tecidos dos moluscos.

Os vírus NLV são considerados como o agente infeccioso de maior importância epidemiológica na contaminação dos moluscos, já que causam gastroenterites severas e a população não possui imunidade aos mesmos. Entretanto, os adenovírus que também são encontrados como contaminantes dos moluscos, podem não ser altamente infecciosos (no caso dos adenovírus respiratórios), porém são considerados como um importante indicador de contaminação fecal (PINA et al., 1998; HERNROTH et al., 2002; GIRONES, 2002).

Devido a falta de controles positivos (fezes positivas para NLVs) para realização de testes futuros com tecidos dissecados, decidiu-se interromper os estudos com os vírus Norwalk-like, sendo que os trabalhos de padronização prosseguiram com os adenovírus, que foi selecionado neste trabalho principalmente pela facilidade na detecção, distribuição e estabilidade no meio ambiente.

## **2- ENSAIOS DE PCR E *NESTED*-PCR UTILIZANDO SUSPENSÕES DE Ad5 PADRÃO E OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS**

A padronização da reação de PCR foi realizada após a obtenção de suspensões celulares estoque de adenovírus padrão. A seqüência gênica selecionada para a amplificação foi a do gene *hexon*, por codificar a proteína *hexon*, comum a todos os adenovírus (Figura 6). Os fragmentos de 300pb na reação de PCR e de 143pb na reação de *nested*-PCR (Figura 12), estão de acordo com o esperado para a amplificação da seqüência entre os nucleotídeos 18858 e 19158 (PCR) e 18937 e 19079 (*nested*-PCR) do referido gene (ALLARD et al., 1992).

No Item 5.1 em métodos, foi definida a concentração ideal de DNA amplificado a partir das suspensões de Ad5 padrão e dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas, na reação de *nested-PCR*, a fim de diminuir a quantidade de bandas inespecíficas. Após a reação de *nested-PCR*, verificou-se que, utilizando 1µl de DNA amplificado a partir de extratos de ostras experimentalmente inoculadas, houve uma diminuição nas bandas inespecíficas (Figura 11, linhas 5, 6, 7). Com relação às suspensões de Ad5 padrão, não se observou diferença entre as concentrações de DNA viral (Figura 11, linhas 2, 3, 4). Estes resultados estão de acordo com Allard et al. (1992), que também testou diversas concentrações de DNA na reação de *nested-PCR*.

A aplicação da reação e PCR na área ambiental depende de diversos parâmetros, tais como a concentração dos reagentes e as temperaturas envolvidas no processo, os quais podem comprometer a sua especificidade e sensibilidade (DIEFFENBACH et al., 1995). Tais parâmetros foram padronizados e descritos anteriormente por Allard et al. (1992), Pina et al. (1998), e foram avaliados neste trabalho.

No presente estudo, a detecção de adenovírus foi baseada em diferentes métodos, tendo sido as reações de PCR e *nested-PCR* diretamente das suspensões de Ad5 padrão e extratos de ostras experimentalmente inoculadas e de cultivo, e a reação de PCR com amostras previamente cultivadas em células (ICC-PCR).

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade dos ensaios de PCR e *nested-PCR*, para a detecção de adenovírus, amostras de suspensões de Ad5 padrão e de extratos de ostras experimentalmente inoculadas, foram diluídas seriadamente (Itens 11.1 e 11.2, respectivamente), e após a extração do DNA viral, realizou-se as reações de PCR

e *nested*-PCR. Com relação à suspensão de Ad5 padrão, o limite mínimo de detecção foi de 16 PFU/ml na reação de PCR e de  $1,6 \times 10^{-4}$  PFU/ml na reação de *nested*-PCR (Figura 12).

A Figura 13 mostra os resultados dos limites de sensibilidade para detecção viral nos extratos de ostras experimentalmente inoculadas, onde a sensibilidade de amplificação por PCR foi de  $1,2 \times 10^2$  PFU/g de ostra e por *nested*-PCR foi de 1,2 PFU/g de ostra. Desta forma, ao comparar os resultados obtidos utilizando as reações de PCR e *nested*-PCR, constatou-se que a diferença na detecção foi de 5 log para a suspensão de Ad5 padrão e de 2 log para extratos de ostras experimentalmente inoculadas. Os autores Allard et al. (1990), Puig et al. (1994) demonstraram a necessidade de utilização a reação de *nested*-PCR a fim de aumentar o limite de sensibilidade na detecção de adenovírus presentes em amostras clínicas e ambientais. Pina et al. (1998) verificaram o limite de sensibilidade utilizando 2 passos de amplificação para detectar adenovírus em amostras ambientais, obtendo valores de 1 a 10 partículas virais após a reação de *nested*-PCR.

### **3- ENSAIO DE PCR ASSOCIADO À CULTURA CELULAR (ICC-PCR) PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS EM OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS.**

Nos últimos anos, tem se sugerido novas tentativas para contornar os problemas associados à detecção da contaminação viral no meio ambiente. Reynolds et al. (1996; 2001), Grabow et al. (1999) propuseram a associação da clássica metodologia de cultura celular com a técnica de PCR para solucionar um dos problemas

desta técnica, que é facilmente inibida por substâncias comumente presentes em amostras ambientais.

As desvantagens da detecção da contaminação viral no meio ambiente, utilizando a técnica de infecção de células em cultura, são a baixa especificidade, o longo período de tempo empregado para a detecção viral, e o fato de não poder realizá-la com vírus de difícil adaptação em cultura, presentes em contaminações ambientais como o HAV e o vírus Norwalk (REYNOLDS et al., 1996, 2001). A grande maioria dos adenovírus é adaptado a cultura celular, razão pela qual foi possível a utilização desta técnica no desenvolvimento deste trabalho utilizando Ad5 padrão.

Para realização deste ensaio, determinou-se previamente qual a diluição não citotóxica do extrato de ostras através do ensaio de citotoxicidade (Item 12). Observou-se que a partir da diluição  $10^{-2}$  do extrato de ostras não ocorreu citotoxicidade nas células HEp-2 (Tabela 6).

No ensaio de ICC-PCR para as suspensões de Ad5 padrão, no tempo de 24h, foi possível detectar a presença de adenovírus até a concentração de  $1,6 \times 10^3$  PFU/ml. À medida que o período de incubação foi aumentado, o limite de sensibilidade também foi, havendo assim uma relação entre estes até o período de incubação de 48h. A partir de 48h até 96h de incubação, o limite de sensibilidade permaneceu inalterado e foi de 1,6 PFU/ml (Tabela 7).

O ensaio de ICC-PCR para os extratos de ostras demonstrou que o período de 24h de incubação não foi suficiente para detectar os adenovírus presentes nos extratos, provavelmente, pela baixa concentração destes. A partir de 48h de incubação houve um aumento na sensibilidade passando de  $1,2 \times 10^3$  PFU/ml em 48h para  $1,2 \times 10^2$  PFU/ml nos tempos de 72 e 96h (Tabela 9 e Figura 14). A associação das duas

técnicas não demonstrou maior eficiência, já que o limite de sensibilidade atingido foi igual ao da reação de PCR. Possivelmente, a sensibilidade de detecção seria maior se houvesse incubação por um período de tempo maior na cultura de células ou a realização da reação de *nested*-PCR a fim de aumentar o limite de sensibilidade na detecção de adenovírus. Porém estes passos adicionais na detecção destes vírus tornariam sua utilização inviável na rotina de um laboratório devido ao tempo demandado e principalmente ao alto custo das reações.

#### **4- ENSAIOS DE PCR E *NESTED*-PCR PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS PRESENTES EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Em relação às amostras ambientais coletadas de abril a outubro de 2002, as mesmas foram analisadas para verificar a presença de adenovírus através das técnicas de PCR e *nested*-PCR.

A Tabela 9 e Figura 15 demonstram os resultados obtidos após análise das amostras ambientais por PCR e *nested*-PCR, onde se observou que somente com uma etapa de amplificação, não foi possível detectar a presença de adenovírus nas ostras coletadas nos três diferentes sítios de cultivo, provavelmente devido à baixa concentração destes vírus nos tecidos das ostras. Em contrapartida, quando foi realizada mais uma etapa de amplificação por *nested*-PCR, o índice de positividade chegou a 90%, ou seja, 18 amostras positivas das 20 analisadas (Figura 15). As amostras negativas foram as dos meses de abril e maio, nos sítios 2 e 3, respectivamente (Figura 15 A). Este resultado confirma o obtido experimentalmente na verificação do limite de sensibilidade utilizando a *nested*-PCR. Este alto índice de

positividade também confirmou que é desnecessário aplicar o ICC/PCR para detecção de adenovírus no campo, bastando o *nested*-PCR para aumentar a sensibilidade da reação.

Pina et al. (1998), verificaram a presença de adenovírus, vírus da hepatite A e enterovírus em 3 pontos de cultivo na Espanha. Adenovírus foram detectados após a reação de *nested*-PCR em 14 das 15 amostras analisadas, 6 das 15 amostras foram positivas para enterovírus por PCR e nenhuma foi positiva para o vírus da Hepatite A, comprovando a grande incidência dos adenovírus no meio ambiente. Estes autores sugerem a utilização dos adenovírus como um indicador biológico de contaminação viral humana no meio ambiente devido a sua alta incidência no meio ambiente e resistência à inativação por luz UV e aos tratamentos convencionais de esgoto.

Hernroth et al. (2002) relataram a presença de adenovírus em amostras de moluscos e identificaram como sendo principalmente os tipos respiratórios, que normalmente circulam na sociedade e podem ser excretados pelas fezes por um longo período de tempo.

Durante a coleta das amostras de ostras, também foram coletadas amostras de água (meses de junho a outubro) nos mesmos sítios de cultivos a fim de analisar a qualidade bacteriológica da água, verificando os índices de contaminação por coliformes totais e fecais. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos nos três sítios de cultivo.

Segundo a resolução CONAMA nº20 de 18/06/1986, art. 8º item f, "... o uso da água do mar para o cultivo natural e/ou intensivo de espécies destinadas à alimentação humana e que serão ingeridas cruas, não deverá exceder uma concentração média de 14 coliformes fecais por 100ml de água. Não mais de 10% das amostras poderão

exceder 43 coliformes fecais por 100ml de água em 80% das amostras mensais colhidas em qualquer mês”. Os resultados obtidos demonstram que, em pelo menos quatro meses (80%) as amostras apresentaram uma média de 14 NMP/100ml, com nenhuma amostra (10% = 0,5) excedendo 43 NMP/100ml.

Os sítios 1 e 2 apresentaram três meses de contaminação (valores acima de 14NMP/ml) e o sítio 3 somente um mês. É importante ressaltar que os meses em que a contaminação foi maior, durante a coleta estava chovendo, o que pode estar relacionado com estes dados, já que em época de chuva o fluxo de água doce e conseqüentemente de descarga de esgoto nos efluentes aumenta.

Não foi possível verificar uma correlação entre os índices de coliformes e a presença de vírus no meio ambiente, uma vez que, mesmo quando os níveis de coliformes eram aceitáveis, foi verificada a presença de adenovírus nos tecidos dos moluscos. Como os coliformes são facilmente inativados pelos procedimentos de tratamento de água ou efluentes estes dados vieram mais uma vez confirmar que um número aceitável de bactérias não assegura a inexistência de outros patógenos resistentes à inativação, tais como os vírus entéricos (SATO et al., 1992; PINA et al., 1998; LEES, 2000; HERNROTH et al., 2002).

A fim de assegurar a qualidade sanitária dos moluscos de cultivo, o objetivo principal deste trabalho foi padronizar uma metodologia sensível e eficiente, capaz de ser utilizada em análises de rotina no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.

A utilização dos adenovírus como um indicador de área “livre” de contaminação viral pode ser uma garantia de qualidade sanitária em pontos de cultivo de moluscos (HERNROTH et al., 2002).

Este trabalho demonstrou também a necessidade de estudos mais aprofundados na padronização envolvendo a reação de PCR para NLVs presentes em ostras, principalmente devido à importância epidemiológica destes vírus.

## **CONCLUSÕES**

---

Através dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que:

- A reação de PCR padronizada no presente estudo foi eficiente para a detecção de adenovírus presentes em moluscos.
- A reação de *nested*-PCR demonstrou maior sensibilidade na detecção de adenovírus em ostras experimentalmente inoculadas e de cultivo. É recomendável a utilização de uma segunda reação de amplificação para a detecção destes vírus em amostras de ostras, uma vez que as partículas virais, geralmente, estão em baixa concentração nestes moluscos.
- Foi encontrada a presença de adenovírus através da reação de *nested*-PCR em 90% das amostras de ostras coletadas em três sítios de cultivo em Florianópolis – SC.
- A análise bacteriológica da água nos sítios de cultivo indicou a contaminação por coliformes fecais nos três sítios em níveis não aceitáveis pela legislação vigente, principalmente durante o período de chuvas.
- O ensaio de ICC-PCR, não demonstrou vantagens em relação à reação de *nested*-PCR para a detecção de adenovírus em extratos de ostras experimentalmente inoculadas.

- Não foi possível detectar os NLVs em ostras experimentalmente inoculadas através da técnica de PCR proposta neste trabalho, necessitando estudos mais aprofundados para sua padronização.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

O presente trabalho permitiu padronizar as metodologias de PCR e *nested*-PCR para utilização de adenovírus como um indicador de contaminação viral no meio ambiente, visando o monitoramento da sanidade dos moluscos de cultivo.

Este trabalho sugere, como perspectivas, a identificação dos subgêneros de adenovírus detectados neste estudo através da utilização da reação de PCR e da análise por enzimas de restrição (RFLP), bem como o teste de diferentes protocolos para a detecção de NLVs presentes em ostras; assim, seria possível utilizá-lo juntamente com o adenovírus no monitoramento das amostras ambientais.

***REFERÊNCIAS***

---

- ABBASZADEGAN, M.; STUWART, P.; LeCHEVALIER, M. – A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65(2)**: 444-449, 1993.
- AHMED, F. E. - Review: Assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with microorganisms, parasites and natural toxins in the US. **Inter J. of Food Sci. And Tech**, **27**: 243-260, 1992.
- ALLARD, A.; GIRONES, R.; PER JUTO; WADELL, G. – Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 2659-2667, 1990.
- ALLARD, A.; ALBINSSONN, B.; WADELL, G. – Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **J. Med. Microbiol.**, **37**: 149-157, 1992.
- ALLARD, A.; KAJON, A.; WADELL, G. – Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polimerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **44**: 250-257, 1994.
- ANDO, T.; MONROE, S. S.; GENTSCH, J. R.; JIN, Q.; LEWIS, D. C.; GLASS, R. I. – Detection and differentiation of antigenetically distinct small round structured virus (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 64-71.
- APHA, AWWA, WPCF – **Standard methods for the examination of water and wastewater americam public health association**. Waschingon, D.C., USA, 1995, 19<sup>th</sup> Dec.
- ARNAL, C.; FERRE-AUBINEAU, V.; MIGNOTE, B.; IMBERT-MARCILLE, B.M.; BILLAUDELL, S. – Quantification of hepatitis A virus in shellfish by competitive

reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65(1)**: 322-326, 1999.

ATMAR, R.; NEILL, F.; ROMALD, J. – Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 3014-3018, 1995.

AVELLÓN, A.; PÉREZ, P.; AGUILAR, J.C.; LEJARAZU, R.O.; ECHAVARRÍA, J.E. – Rapid and sensitive diagnosis of human adenoviruses infections by generic polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.**, **92**: 113-120, 2001.

BARARDI, C. R. M.; YIP, H.; EMSLIE; K. R., VESEY; G. SHANKER; S.R. AND WILLIAMS; K. L. - Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int. J. Food Microbiol.** **49**: 9-18, 1999.

BARARDI, C. R. M.; SIMÕES; C. M. O .; SANTOS, C. S. - Ostras de Qualidade em Santa Catarina. **Ciência Hoje**, **29**: 70-73, 2001.

BEURET, C. – A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. **J. Virol. Meth.**, **107**: 1-8, 2003.

BMLP- Brazilian Mariculture Linkage Program, apostila. Brasil, 2000.

BOSCH, A .; PINTO, R. M.; ABAD, P. X. - Differential accumulation and depuration of human enteric viruses by mussels. **Wat. Sci. Tech.**, **31 (5-6)**: 447-451, 1995.

BOUCHRITI, M. & GOYAL, S.M. – Methods for the concentration and detection of human enteric viruses in shellfish: a review. **Microbiologica**, **15**: 105-114, 1993.

BURLENSON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L – Plaque assay. In- **Virology: a laboratory manual**. San Diego, Academic press, 1992. p 74-84

- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. “Norwalk-like viruses”: Public health consequences and outbreak management. **MMWR** 2001; **50 (No. RR-9)**: 1-17.
- CHAPRON, C.; BALLESTER, M.; FONTAINE, L.; FRADES, C.; MARGOLIN, A. – Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenoviruses types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Appl. Environ. Microbiol.**, **66**: 2520-2525, 2000.
- CHEESBROUGH, J. S.; GALLIMORE, C. L.; WRIGHT, P. A.; BROWN, D. W. – Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. **Epidemiol. Infect.** **125**:93-8, 2000.
- CHO, H.B.; LEE, S.; CHO, J.; KIM, S. - Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. **Can. J. Microbiol.**, **46**: 417-424, 2000.
- COELHO, C.; HEINERT, A.P.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. – Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Food Protection**, **66(3)**: 2003 “In press”.
- CONAMA - Ministério do Desenvolvimento Urbano e do Meio Ambiente - Conselho Nacional do Meio Ambiente - Diário Oficial da União, 20 de dezembro de 2000. **Resolução/ CONAMA/ n. 020/00, 2000.**
- CRABTREE, K.B.; GERBA, C.P.; ROSE, J.P.; HAAS, C.N. – Waterborne adenovirus: a risk assessment. **Wat. Sci. Thec.** **35**: 11-12, 1997.

- CRAUN, F. G. - Statistic of waterborne outbreaks in the U.S.A . (1920-1980). In Waterborne diseases in the United States CRAUN, F. G. ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 73-159p. 1986.
- CROMEANS, T. L., NAINAN O. V. AND MARGOLIS H. S. - Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**: 2460-2463, 1997.
- DIEFFENBACH, C.W.; DVESKLER, G.S. – Introduction to PCR. In:\_\_\_\_PCR primer, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. p. 1-63.
- DIX, A. & JAYKUS, L. –Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hand-shelled clams. **Journal of Food Protection**, **61 (4)**: 458-465, 1998.
- ELNIFRO, E.; COOPER, R.; KLAPPER, P.; BAYLEY, A. – PCR and restriction endonuclease analysis for rapid identification of human adenovirus subgenera. – **J. Clin. Microbiol.**, **38**: 2055-2061, 2000.
- ENRIQUEZ, C.E.; HURST, C.J.; GERBA, C.P. – Survival of enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wast water. **Wat. Res.**, **29**: 2548-2553, 1995.
- EPAGRI, *Biologia e Cultivo de Mexilhões*, 2ed. Epagri, 2000.
- FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. – Adenoviruses. In: \_\_\_\_**Virology**, Philadelphia: Lippicort- Raven Publishers, 1996. p. 2149-2171.
- FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANELLO, V.R.; SKALKA, A.M. – Virus structure. In:\_\_\_\_ **Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis and control**, Washington D.C.: ASM Press, 2000. p. 59-97.

- GAMA, R. E.; HORNSNELL, P. R.; HUGHES, P. J.; NORTHE, C.; BRUCE, C. B.; AL NAKIB, W. AND STANWAY, G. - Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using PCR. **J. Med Virol.** **28**: 73-77, 1989.
- GERBA, C.P.; KESWICK, B.H.; DUPONT, H.L.; FIELDS, H.A. – Isolation of rotavirus and hepatitis A from drinking water. – **Monogr. Virol.**, **15**: 119-125, 1984.
- GERBA, C.P. & ROSE, J.B. – Viruses in source and drinking water. In: \_\_\_\_ Drinking water microbiol, New York: Springer-Verlag, 1990. p. 380-395.
- GRABOW, W.; BOTMA, K.; DE VILLERS, J.; CLAY, C.; ERASMUS, B. – Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. **Bulletin of the World Health Organization**, **77(12)**: 973-980, 1999.
- GREEN, D.H. & LEWIS, G.D. – Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription PCR and cell culture. **Wat. Research**, **33(5)**: 1195-1200, 1999.
- HERNROTH, B.E.; CONDEN-HANSON, A.C.; REHNSTAN-HOLM, A.S.; GIRONES, R.; ALLARD, A.K. – Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Appl. Environ. Microbiol.**, **68(9)**: 4523-4533, 2002.
- HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M.V. – Detection of viruses in environmental waters, sewage, and sludges. – Detection of the presence of bacteria and viruses in shellfish. In: \_\_\_\_ **Manual of Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology. Washington, DC, ASM Press 1997. p 168-175, 203-212.

- IRITANI, N.; SETO, Y.; HARUKI, K.; KIMURA, M.; AYATA, M.; OGURA, H. – Major change in the predominant type of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka city, Japan, between april 1996 and march 1999. **J. of Clin. Microbiol.** **38**: 2649-2654, 2000.
- JAYKUS, L.; HEMARD, M. T.; SOBSEY, M. D. - Human enteric pathogenic viruses. In: HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D. (ed.) - Environmental Indicators and Shellfish Safety. New York, Chapman and Hall, 1994, 92-153p.
- JAYKUS, L.; DE LEON, R.; SONSEY, M. D. - A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. **Appl. Enviro. Microbiol.**, **62 (6)**: 2074-2080, 1996.
- JIANG, S.; NOBLE, R.; CHU, W. – Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California.. **Appl. Enviro. Microbiol.**, **67**: 179-184, 2001.
- KIDD, A.H.; JONSSON, M.; GARWICZ, D.; KAJON, A.E.; WERMENBOL, A.G.; VERWEIJ, N.W.; JONG, J.C. – Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. **J. Clin. Microbiol.** **34**: 662-627, 1996.
- KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.; JEFRIES, D.J. - Design and testing of antiviral compounds. In: DESSELBERGER, U. Medical Virology: a pratical approach. New York, OIRL Press, 1995. p. 153-154.
- KOPECKA, H., DUBROU, S., PREVOT, J., MARSHALL, J., AND LOPES-PILA, J. M. - Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction and hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59 (4)**: 1213-1219, 1993.
- LCMM – **Projeto BMLP-LCMM**. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos. Disponível na Internet. <http://www.lcmm.ufsc.br>. 2001.

- LEES, D. N.- Viruses and bivalve shellfish - **Intern. J. of Food Microb.**, **59**: 81-116, 2000.
- LEGEAY, O.; CAUDRELIER, .; CORDEVANT, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LANGE, M. – Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. **J. of Virol. Meth.**, **90**:1-14, 2000.
- LE GUAYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, L.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. – Three-Year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Appl. and Env. Microbiol.**, **66 (8)**: 3241-3248, 2000.
- LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; DORÉ, W. - Developments of a method for detection of enterovirus in shellfish by PCR with poliovirus as a model. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60 (8)**: 2999-3005, 1994.
- LEWIS, G.D. & METCALF, T.G. - Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A virus and human rotavirus, from oysters, water and sediment samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **54 (8)**: 1983-1988, 1988.
- MEDEIROS, M.I.C.; NEME, S.N.; SILVA, P.; CAPUANO, D.M.; ERRERA, M.C.; FERNANDEZ, S.A.; VALLE, G.R.; AVILA, F.A. - Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Ver. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, **43**: 21-24, 2001.
- METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. - environmental Virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. **Annu. Rev. Microbiol.**, **49**: 461-487, 1995.
- MOENPHO, S.; MAUL, A.; MIGNOTTE-CADIERGUES, B.; SCHWARTZBROD, L.; BILLAUDEL, S.; FERRÉ, V. - Best viral elution method available for quantification of

- enteroviruses in sludge by both cell-culture and reverse transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **67**: 2484-2488, 2001.
- MUNIAIN-MUJICA, J.; GIRONES, R.; TOFIÑO-QUESADA, G.; CALVO M.; LUCENA, F. – Depuration dynamics of viruses in shellfish. **J. food Microbiol.**, **77**: 125-133, 2002.
- MUNIAIN-MUJICA, J.; GIRONES, R.; TOFIÑO-QUESADA, G.; CALVO M.; LUCENA, F. – Depuration dynamics of viruses in shellfish. **J. food Microbiol.**, **77**: 125-133, 2002.
- NASCIMENTO, I. A . - Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura** **7** (35): 871-876, 1983.
- NATIONAL ADVISORY COMMITTEE - Microbiological criteria for raw molluscan shellfish. **J. Food Protect.** **55** (6): 463-480, 1992.
- NICAND, E.; TEYSSOU, R.; BUISSON, Y. - Le risque fécal virale. **Virology**, **2**: 103-116, 1998.
- PEARSE, V.; PEARSE, J.; BUCHSBAUM, M.; BUCHSBAUM, R. – **Living Invertebrates**. The Boxwood Press. California, 1987.
- PEELER, J.T.; HOWGHTBY, G.A.; RAINUSEK, A.P. – The most probable number technic. In:\_\_\_**Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods**. American Public Health Association. Alpha, 1999. p. 105-119.
- PINA, S.; PUIG, N.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. – Viral pollution in the environmental and shellfish: human adenoviruses in polluted waters by nested-PCR amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64** (9): 3376-3382, 1998.

- PINTÓ, R.M.; GAJARDO, R.; ABAD, F.X.; BOSCH, A. - Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. **Environ. Sci. Technol.**, **29**: 2636-2638, 1995.
- PUIG, N.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R.; ALLARD, A.; WADELL, G. – Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested-PCR amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 2963-2970, 1994.
- QIAO, H.; NILSSON, M.; ABREU, E.R.; REDLUND, K.O.; JOHANSEN, K.; ZAORI, G., SVENSSON, L. – Viral diarrhea in children in Beijing, China. **J. Med. Virol.**, **57**: 390-396, 1999.
- REED, L.J. & MUENCH, H. – A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, **27(3)**: 483-497, 1938.
- REGAN, P. M.; MARGOLIN, A. B.; WATKINS, W. D. - Evaluation of microbial indicators for the determination of the sanitary quality and safety of shellfish. **J. Shellfish Res.**, **12**: 95-100, 1993.
- REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. – Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture – PCR procedures. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62 (4)**: 1424-1427, 1996.
- REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; ABBASZADEGAN, M.; PEPPER, I.L. – ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A environmental samples. **Can. J. Microbiol.**, **47**: 153-157, 2001.
- ROWE, W.P.; HUEBNER, R.J.; GILMORE, L.K.; PARROT, R.H.; WARD, T.G. – Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration on tissue culture. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **84**: 570-573, 1953.

- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. - **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second Edition- Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1 1, 2, 3, 2001. Section 6: 6.39-6.44.
- SANTOS, C. S., RIGOTTO, C., SIMÕES, C. M. O ., BARARDI, C. R. M. - Improved Method for Rotavirus Detection in Oysters Using RT-PCR: Suitability of a Commercial PCR kit. **J. Shellfish Res.**, **20(3)**: 997-1001, 2001.
- SANTOS, C. S., RIGOTTO, C., SIMÕES, C. M. O ., BARARDI, C. R. M. - Detection of Viable Rotaviruses in Shellfish by means of Cell Culture and Immunofluorescence Assay. **J. Food Sci.**, **67(5)**: 1968-1871, 2002.
- SATO, M. I. Z.; MONTEIRO, C. K.; STOPPE, N. C.; SANCHEZ, P. S.; OSTINI, S.; MATTÉ, G. R. – Shellfish and marine water microbiological quality. **Environ. Toxic. Water**, **7**: 95-105, 1992.
- SCHWAB, K. J., DE LEON R. AND SOBSEY. M. D. - Concentration and purification of beef extracts mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse-transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**: 531-537, 1995.
- SCHWAB, K. J., DE LEON R. AND SOBSEY. M. D. – Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **62 (6)**: 2086-2094, 1996.
- SCHWAB, K. J.; NEILL, F. H.; ESTES, M.; METCALF, T.; ATMAR, R. – Distribution of Norwalk viruses within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. **J. Of food Protection**, **61 (12)**: 1674-1680, 1998.

- SCHWAB, K. J.; NEILL, F. H.; FANKHAUSER, R. L.; DANIELS, N. A.; MONROE, S. S.; BERGMIRE-SWEAT, D. A.; ESTES, M.; ATMAR, R.; Development of methods to detect “Norwalk-like viruses” (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food borne NLVs outbreak. **Am. Society for Microbiol.** **66 (1):** 213-218, 2000.
- SCHWAB, K. J.; NEILL, F. H.; LE GUYADER, F.; ESTES, M.; ATMAR, R. - Development of reverse transcription PCR – DNA enzyme immunoassay for detection of “Norwalk-like” viruses and hepatitis A viruses in stool and shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, **67 (2):** 742-749, 2001.
- SCIPIONI, A.; DAUBE, G.; THIRY, E. – La contamination de l'eau et des aliments par les virus pathogènes pour l'homme. **Ann. Méd. Vét.**, **144:** 207-221, 2000.
- SHIEH, Y.S.C.; BARIC, R.S.; SOBSEY, M.D. – Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63(11):** 4401-4407, 1997.
- SHIEH, Y.S.C.; CALCI, K.R.; BARIC, R.S. – A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters **Appl. Environ. Microbiol.**, **65:** 4709-4714, 1999.
- SHIM, W.J.; OH, J. R.; KAHNG, S.H.; SHIM, J.H.; LEE, S. H. – Accumulation of tributyl- and triphenyltin compounds in pacific oysters *Crassostrea gigas*, from the Chinhae Bay System, Korea . **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, **35:** 41-47, 1998.
- SMAAL, A. C. & WIDDOWS, J. – The scope for growth of bivalves as an integrated response parameter in biological monitoring. In: KRAMER, K. J. M., ed., **Biomonitoring of coastal waters and estuaries**. Boca Raton FL, CRC press, 1994. p. 247-267.

- SOARES, C.C.; VOLOTÃO, E.M.; ALBUQUERQUE, M.C.M.; SILVA, F.M.; CARVALHO, T.R.B.; NOZAWA, C.M.; LINHARES, R.E.; SANTOS, N. – Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **J. Clin. Virol.**, **23**: 171-177, 2002.
- SOBSEY, M.; CARRICK, R.; JENSEN, H. – Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **36**: 121-130, 1978.
- ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S.C.; PELLETIER, E.; ST-LOUIS, R. -Butyltin concentrations in sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) of the southern gulf of St. Lawrence, Canada. **Environ Technol.**, **20**: 181-189, 1999.
- STRAUB, T.M.; PEPPER, J.L. ABBASZADEGAN, M.; GERBA, C.P. – A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60(3)**: 1014-1017, 1994.
- TRABELSI, A.; GRATTARD, F.; NEJMEDDINE, M.; BOURLET, T.; POZZETO, B. – Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell-culture. **J. Cli. Microbiol.**, **33 (9)**: 2454-2457, 1995.
- TORTORA, G.J.; FUNK, B.R.; CASE, C.L.; CASOLI, K. – Doenças microbianas do sistema digestório. In:\_\_\_\_\_ **Microbiologia**, Porto Alegre: artes Médicas Sul, 2000. p. 659-685.
- UHNOO, I.; WADELL, G.; SVENSSON, L.; JOHANSSON, M.E. – Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis en infants and young children. **J. Clin. Microbiol.**, **20**: 365-372, 1984.

VINATEA, C.E.B. – **Detecção e quantificação de poliovírus em ostras-do-pacífico (*Crassostrea gigas*), através de cultura celular e RT-PCR.** Florianópolis, 2002 (Tese-Mestrado-Universidade Federal de Santa Catarina).

WADELL, G. – Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110:** 191-220, 1984.

WARD, J. E.; Biodinamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. **Invertebrate Biology, 115 (3):** 218-231, 1996.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. – Viral Syndromes. In:\_\_\_\_\_ **Medical Virology**, San Diego: Academic Press, 1994. p. 569.

WINCKLER, S.; GRUMANN, A .; NETO, F.; ROCKZANSKI, M. - Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: aquicultura e pesca. Florianópolis, EPAGRI, 1998.